

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Sénescence prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes diploïdes de poumon humain: Etude de la néosynthèse protéique, de marqueurs associés aux membranes et du rôle de Cdc42, Rac1 et p38MAPK

Chrétien, Aline

Award date:
2008

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FUNDP
Facultés des Sciences
Département de Biologie
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Belgique

**Sénescence prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez
des fibroblastes diploïdes de poumon humain:**

**Etude de la néosynthèse protéique, de marqueurs associés aux membranes
et du rôle de Cdc42, Rac1 et p38^{MAPK}**

Chrétien Aline

Promoteur: Dr. O. Toussaint

Manuscrit de défense

Dissertation présentée
en vue de l'obtention du diplôme
de Docteur en Sciences



FUNDP
Facultés des Sciences
Département de Biologie
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Belgique

Sénescence prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes diploïdes de poumon humain:

Etude de la néosynthèse protéique, de marqueurs associés aux membranes et du rôle de Cdc42, Rac1 et p38^{MAPK}

La sénescence prématurée est induite chez des fibroblastes diploïdes humains entre deux et trois jours après un traitement avec une concentration sublétalement de peroxyde d'hydrogène. Ce phénotype est notamment caractérisé par une morphologie étalée, un arrêt irréversible du cycle cellulaire et une activité β -galactosidase associée à la sénescence. Selon des études précédentes, il semble que la néosynthèse protéique soit importante pour l'établissement de la morphologie aplatie, élargie et irrégulière des cellules en sénescence induite par H_2O_2 . De plus, il a été montré que la neutralisation du TGF- β 1 par des anticorps spécifiques altère cette morphologie induite par le traitement de fibroblastes avec H_2O_2 . Étant donné que les mécanismes impliqués dans l'apparition de la morphologie sénescence sont peu compris, nous avons étudié la néosynthèse de protéines cytoplasmiques dépendante ou indépendante du TGF- β 1, entre le jour deux et trois après le traitement de fibroblastes avec H_2O_2 et avons identifié des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette : l'eitrine, la caldesmone et HSP27.

Rac1, Cdc42 et la cavéoline 1 ont été définies dans la littérature comme étant impliquées dans la morphogénèse typique lors de la sénescence répliquative et de la sénescence prématurée induite par H_2O_2 (dans le cas de la cavéoline 1). Nous avons étudié l'activation de Rac1 et Cdc42, la phosphorylation de la cavéoline 1 suite au traitement H_2O_2 et avons étudié l'effet de l'inactivation de ces protéines ainsi que celle de p38^{MAPK} sur la morphologie des fibroblastes. De plus, nous avons montré que Cdc42 pouvait activer p38^{MAPK} vice-versa, pendant le traitement avec H_2O_2 .

En parallèle de cette étude, nous avons tenté d'analyser l'abondance différentielle de protéines membranaires au jour 3 après le traitement des fibroblastes avec H_2O_2 . Ceci nous a permis d'étudier la surexpression d'une protéine pouvant être associée aux membranes et au cytosquelette d'actine : l'annexine 2.

Ce travail permet de mieux comprendre les mécanismes mis en place par les fibroblastes pour entrer en sénescence prématurée, et plus particulièrement pour présenter une morphologie étalée lors de ce processus.



FUNDP
Facultés des Sciences
Département de Biologie
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur
Belgique

Premature senescence induced by stress with hydrogen peroxide in human lung diploid fibroblasts:

Study of protein neosynthesis, of markers associated with the membranes and role of Cdc42, Rac1 and p38^{MAPK}

Premature senescence is induced in human diploid fibroblasts between day 2 and 3 after treatment with hydrogen peroxide at sublethal concentration. This phenotype is namely characterized by a spread out morphology, irreversible growth arrest and senescence associated β -galactosidase activity. Previous studies suggested that protein neosynthesis is important for establishment of the flattened, widened and irregular morphology of the senescent cells induced by H_2O_2 . Moreover, it was shown that the neutralization of TGF- β 1 by specific antibodies alters this morphology induced by treatment with H_2O_2 . Since the mechanisms involved in senescent morphogenesis are not well understood, we studied the TGF- β 1-dependent and -independent neosynthesis of cytoplasmic proteins, between the days 2 and 3 after treatment of fibroblasts with H_2O_2 and identified proteins involved in the organization of cytoskeleton: ezrin, caldesmon and HSP27.

Rac1, Cdc42 and caveolin 1 were defined in the literature as proteins involved in the regulation of replicative senescent morphology and in the senescent morphology induced by treatment of fibroblasts with H_2O_2 (in the case of caveolin 1). We studied activation of Rac1 and Cdc42, the phosphorylation of caveolin 1 after treatment with H_2O_2 et effect of invalidation of these 3 proteins and p38 α ^{MAPK} on fibroblasts morphology. Moreover, we showed that Cdc42 could activate p38 α ^{MAPK} and vice-versa, during the H_2O_2 treatment.

In parallel of this study, we tried to analyze the differential abundance of membrane proteins at day 3 after the treatment of fibroblasts with H_2O_2 . This allowed to study further a protein associate with the membranes and actin cytoskeleton: annexin 2.

This work allows a better understanding of mechanisms whereby fibroblasts enter premature senescence, and more particularly senescent morphogenesis.

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs José Remacle et Martine Raes de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. I also would like to thank the Professor Peter Roepstorff to have received me in his laboratory.

Merci à Olivier Toussaint, promoteur de ce travail, de m'avoir donné l'opportunité de rester au sein de l'équipe après le mémoire. Merci aussi pour ta patience et ton enthousiasme scientifique.

Je remercie les membres du jury qui ont consacré leur temps à la lecture critique de ce manuscrit.

Voici donc le moment de la petite pensée émue après ces années passées au laboratoire de l'URBC...

Je me dois de commencer ces remerciements par les « GRAS », anciens et nouveaux... Jeanjean (pour tes aides précieuses (comme l'analyse des 2DGE, ou la relecture d'article en construction) à tes apprentissages des diverses techniques (comme l'extraction protéique)), Béatrice (pour les premières lectures d'articles toujours en construction), Emilie (pour les dernières manips), Neil (pour les moments passés ensemble durant ton mémoire, et la découverte de la Cavéoline 1 dans les noyaux !), mais aussi Thierry, Steph, Christophe, Anne-France, Florence, François, Véro R., Véro F., Friedel, Joao, Valérie, Geoffroy, Christelle, Jérémie, Sophie, Jérôme, Sébastien, Jean-Pascal, Patrice, Françoise, Manu ; les StratiCELL-ois (-eurs ?) Michel, Nathalie, Coralie, Mélanie. En espérant n'avoir oublié personne de cette grande équipe-GRAS, je vous remercie tous pour les moments passés ensemble, les conseils en réunion, dans le labo ou en dehors comme lors de nos petits soupers d'équipe...

Merci aux « filles du bureau », Sophie, Véro, Cindy et Céline. Je n'oublierai jamais les pauses improvisées, les longues discussions scientifiques, de potins ou autre, les sorties faites ensemble, les rires et râleries en fonctions des humeurs de chacune, les moments « remonte-moral »...

Merci aux piliers du labo : Edouard (avec un grand E ou un grand « C » pour Chef !), pour tes nombreux conseils sur les protéines, la patience dont tu as toujours fait preuve pour les moments d'apprentissage, les blagues, les rires, les bons moments passés à la salle café ou au gîte de ta belle région, etc. Tu m'as appris énormément, et je ne te dirai jamais assez merci ! Marc, merci pour ta patience devant nos problèmes (mineurs...) informatiques, pour ta disponibilité. J'espère pour toi que tu retrouveras une cible aussi conciliante et diplomate pour tes lancés de trombones vers le bureau d'en face... Merci à Noëlle et Catherine pour les longues heures passées devant le confocal, merci aussi à Andrée pour les commandes de dernières minutes, Martine, Luc et Antoine. Merci aussi à toi, Anne, pour ta disponibilité pour les « aides-papierasse ».

Merci à Andrea, Martin, Karin et Kate, pour votre accueil au sein de votre laboratoire (Odense, Danemark), votre bonne humeur et votre patience face à mon apprentissage de l'utilisation de la spectrométrie de masse. Merci aussi à Manu, Mirène, Shabaz,

Claudia, Elisabetta, Ivo, Manon pour les nombreuses soirées passées ensemble et les pauses-café en regardant tomber la pluie du mois de Mai !
Merci aussi aux « filles de Beaumont », pour les soirées détonantes dans ma ville presque natale, les carnivals sous la pluie... C'est toujours un plaisir de se retrouver ou de discuter des heures au téléphone (n'est ce pas Bebeth ?).

Merci à tous les potes de « guindailles » (avant : le bunker, maintenant : les soirées resto, cinéma...), Marie, Cécilia, Allan, Maëlys (pas pour les sorties mais plutôt pour les moments de détente lors du bain et du biberon !), Marie, Olivier, Marie, Jeanjean, David, Pascaline, Fred, Laurence, Gégé, Ben, Sophie, Jean-Marc, Les Bio's...

Mes remerciements les plus chaleureux vont à ma famille et « nouvelle » belle-famille, pour vos encouragements et votre soutien durant ces longues années pour lesquelles vous m'avez écoutée me plaindre, râler (puisque c'est ce que je fais de mieux !), et me poser 1000 questions... Papa et Maman, c'est parce que vous avez toujours cru en moi que je suis arrivée au bout !

Et le meilleur pour la fin... MERCI Stéphane, tu sais aussi bien que moi que ces quelques lignes de remerciements ne seront pas suffisantes pour te prouver que ta patiente (et elle est Grande ;o), tes encouragements, ton optimisme, ton soutien, ta compréhension, ton aide et ton point de vue de Biologiste, et tous ces moments auxquels tu étais présent étaient très importants pour moi et m'ont également permis d'en arriver là !

Et puisque (presque) tout est permis dans cette partie de manuscrit, j'ai aussi une petite pensée pour nos adorables petites Misty et Bricole... Leurs ronrons et câlins m'ont été d'une aide précieuse lors des plus grands moments de stress !!

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. CONTEXTE GENERAL	1
II. SENESCENCE REPLICATIVE	1
II.1. Définition	1
II.2. Marqueurs de la sénescence	2
II.2.A. Morphologie cellulaire	2
II.2.B. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence	3
II.2.C. Arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S	3
a. Le cycle cellulaire	3
b. Les kinases dépendantes de cyclines	4
c. Les inhibiteurs de complexes cycline/CDK : famille INK4	5
d. Les inhibiteurs de complexes cyclines/CDK : famille KIP	6
e. La protéine p53	7
f. La protéine du rétinoblastome	7
g. Mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence répllicative	8
II.2.D. Le raccourcissement des télomères	9
II.2.E. Altération du génome mitochondrial	10
II.2.F. Modulation de l'expression génique et protéique lors de la sénescence répllicative	10
a. Etudes transcriptomiques en sénescence répllicative	10
b. Etudes protéomiques en sénescence répllicative	13
III. LES ESPECES REACTIONNELLES DERIVEES DE L'OXYGENE ET STRESS OXYDATIFS	17
III.1. Définition	17
III.2. Site de production des ROS	17
III.2.A. Les ROS d'origine endogène	17
a. La mitochondrie	18
b. Les peroxyosomes	18
c. Les cytochromes p450	19
d. Les NADPH oxydases	19
III.2.B. Les ROS d'origine exogène	19
III.3. Fonction des ROS	20
III.4. Molécules cibles des ROS	21
III.4.A. Oxydation de l'ADN	21
III.4.B. Oxydation des protéines	22
a. Modifications et agrégation des protéines	22
b. Le protéasome	22
III.4.C. Oxydation des lipides	23
III.5. Mécanismes de défense contre les ROS	24
III.5.A. Les enzymes antioxydantes	24
III.5.B. Les molécules antioxydantes non-enzymatiques	25
IV. SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS	26
IV.1. Introduction	26
IV.2. Stress chroniques et aigus sublétaux	26
IV.2.A. Stress chroniques sublétaux	26
IV.2.B. Stress aigus sublétaux	26
a. Généralités	26
b. Traitement avec H_2O_2 de FDHs de poumons foetal de souche IMR-90	28
IV.3. Sénescence induite prématurément par H_2O_2 et transduction du signal	29
IV.3.A. Le TGF- β 1	29
a. Description	29
b. Régulation du TGF- β 1	30
c. Activation du TGF- β 1	30
d. Les récepteurs du TGF- β 1	31
e. Le TGF- β 1 et ses voies de signalisation	31
IV.3.B. p38 ^{MAPK}	34
a. Description	34
b. Activation et régulation	35
c. Substrats	37
IV.3.C. Induction du TGF- β 1 et activation de p38 ^{MAPK} lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 induite par H_2O_2	38
IV.3.D. La cavéoline	39
a. Les cavéoles	39
b. Description de la cavéoline	40
c. Trafic et localisation subcellulaire des cavéolines	41
d. Fonctions de la cavéoline	41

e. Rôle de Cav1 dans la sénescence répliquative et la sénescence prématurée induite par un stress oxydatif	42
V. APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTEOMIQUES	44
V.1. Approches transcriptomiques	44
V.2. Approches protéomiques	45
V.2.A. Les gels à deux dimensions	45
a. Généralités	45
b. Limites des gels à 2 dimensions	46
c. La technique 2D-DIGE	47
V.2.B. La spectrométrie de masse	47
V.2.C. Les techniques alternatives aux gels à deux dimensions	48
a. ICAT	48
b. iTRAQ	49
c. MudPIT	50
d. SILAC	50
V.3. Comparaison des approches transcriptomiques et protéomiques	51
VI. PRESENTATION DES PROTEINES IDENTIFIEES LORS DES ETUDES PROTEOMIQUES REALISEES AU COURS DE CE TRAVAIL	53
VI.1. Ezrine	53
VI.2. HSP27	53
VI.3. Caldesmone	54
VI.4. Annexe 2	55

BUT DU TRAVAIL

RESULTATS

I. ETUDE DE LA NEOSYNTHESE PROTEIQUE ET DES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'ETABLISSEMENT DE LA SENESCENCE PREMATUREE INDUITE PAR UN STRESS SUBLETAL AVEC H ₂ O ₂	60
I.1. Résultats préliminaires : fibres de stress d'actine et détection de p21 ^{WAF-1} lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 induite par H ₂ O ₂	61
I.2. Rôle des changements de néosynthèse protéique indépendants du TGF-β1, de p38α ^{MAPK} et Cdc42 dans la morphogénèse sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène	61
I.3. Localisation subcellulaire de HSP27 lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90	92
I.4. Localisation subcellulaire de phospho-L-CaD lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90	92
I.5. Potentiel migratoire des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée	92
I.6. Surexpression de la cavéoline 1 cytoplasmique et nucléaire chez les FDHs IMR-90 et implication de la cavéoline 1 dans les mécanismes de la sénescence prématurée induite par H ₂ O ₂	93
II. ETUDE DE LA VARIATION D'ABONDANCE DES PROTEINES MEMBRANAIRES OU ASSOCIEES AUX MEMBRANES LORS DE LA SENESCENCE PREMATUREE PAR UN TRAITEMENT SUBLETAL AVEC H ₂ O ₂	109

CONCLUSION

I. ROLE POTENTIEL DE L'EZRINE, HSP27, LA CALDESMONE, p38 ^{MAPK} , CDC42 ET RAC1 DANS LA SENESCENCE PREMATUREE INDUITE PAR H ₂ O ₂	125
I.1. L'ezrine	125
I.2. HSP27	126
I.3. La caldesmone	128
I.4. p38 ^{MAPK} , Cdc42 et Rac1	130
II. CONCLUSION CONCERNANT LES PROTEINES IDENTIFIEES LORS DE L'ETUDE PROTEOMIQUE APRES MARQUAGE METABOLIQUE	133
III. ETUDE DE LA CAVEOLINE 1 LORS DE LA SENESCENCE PREMATUREE	134
IV. ETUDE DE L'ABONDANCE DES PROTEINES MEMBRANAIRES LORS DE LA SENESCENCE PREMATUREE INDUITE PAR H ₂ O ₂	138
IV.1. Généralités	138
IV.2. Annexe A2	140
V. POTENTIEL MIGRATOIRE DES FDHs IMR-90 EN SENESCENCE PREMATUREE ET IMPLICATION POTENTIELLE DE CDC42, RAC1, p38 ^{MAPK} , L'EZRINE, L-CAD ET ANXA2	142
VI. CONCLUSION GENERALE	145

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

2DGE	gels à deux dimensions
actine-F	actine fibrillaire
actine-G	actine globulaire
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
ALK	activin-receptor-like kinase
ANXA2	annexine A2
ARF	alternative reading frame
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATF2	activating transcription factor2
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BMP	bone morphogenetic proteins
CaD	caldesmone
CAK	kinases activatrices de CDK
Cav1	cavéoline 1
CDK	kinase dépendante de cycline
Co-Smad	common-partner-Smad
CTGF	connective tissue growth factor
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FDHs	fibroblastes diploïdes humains
FGF	fibroblast growth factor
GAP	GTPases activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPX	glutathion peroxydase
GSHR	glutathion réductase
GTP	guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HGF	hepatocyte growth factor
HSP	heat shock protein
ICAT	isotope-coded affinity tags
IGF	insulin-like growth factor
IGF-BP	insulin-like growth factor-binding protein
IL	interleukine
iTRAQ	isobaric tagging for relative and absolute quantification
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	latency-associated proteins
LC-MS/MS	liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry
LIMK	LIM domain kinase
LLC	large latent complex
LTBP	latent-TGF-β-binding protein
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAT1	menage a trois 1

Mdm2	mouse double minute 2
MEC	matrice extra-cellulaire
MF	fibroblastes mitotiques
MMO	monooxygénase microsomal
MMP	métalloprotéinase
MNK1	MAPK interaction protein kinase
MRCD	rat mammary cell line
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related cdc-42-binding kinase
MSK	mitogen- and stress-activated kinase
MudPIT	multidimensional protein identification technology
NLS	nuclear localisation sequence
N-WASP	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
O ₂	oxygène moléculaire
PAK1	p21-activated protein kinase1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PI4P5K	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
PKC	protein kinase C
PL	phospholipide
PMF	fibroblastes post-mitotiques
PP1	protein phosphatase
PRAK	p38 regulated/activated kinase
PRDX	peroxyredoxines
Rb	protéine du rétinoblastome
ROCK	Rho-associated coiled-coil protein kinase
ROS	espèce réactionnelle dérivée de l'oxygène
R-Smad	receptor-activated-Smad
SA β -gal	senescence-associated β -galactosidase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis
SILAC	stable labeling by amino acids in cell culture
SIPS	stress induced premature senescence
SM22	smooth muscle 22
SOD	superoxyde dismutase
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TGF- β 1	transforming growth-factor β -1
TNF	tumor-necrosis factor
T β R	récepteur du TGF- β
UV	ultra-violet
VEGF	vascular endothelial growth factor

INTRODUCTION

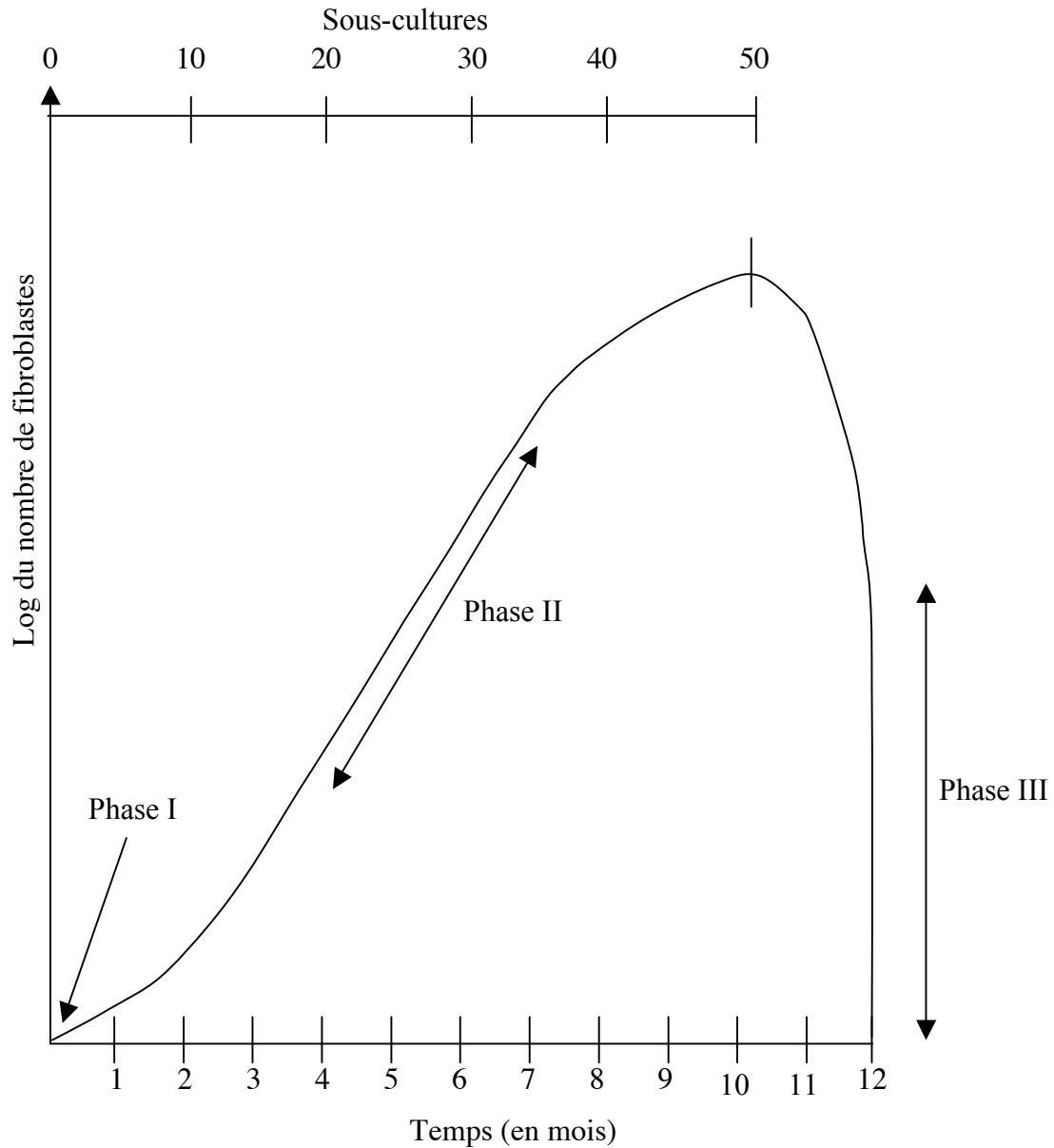


Figure 1 : Représentation graphique des trois phases qui caractérisent une culture de fibroblastes normaux et qui mènent à la sénescence répliquative. Les cellules migrent vers l'extérieur de l'explant de poumon humain et établissent une culture primaire (phase I). Après le premier repiquage, les cellules se divisent de façon exponentielle (phase II). Ensuite, la réplication cellulaire ralentit puis s'arrête de manière irréversible avant de mener à la mort cellulaire (phase III) (d'après Hayflick, 1977).

I. CONTEXTE GENERAL

Le vieillissement est un processus caractérisé par une baisse d'homéostasie et une augmentation de la vulnérabilité d'un organisme. Il en résulte un affaiblissement des réponses aux stimuli environnementaux et une augmentation de la susceptibilité face aux maladies. Ainsi la mortalité augmente avec le vieillissement.

L'environnement socio-économique actuel qui affecte fortement les conditions sanitaires et diététiques joue un rôle remarquable sur la durée de vie de l'homme. Au début du XX^{ème} siècle, la durée de vie moyenne dans les pays industrialisés était de l'ordre de 50 ans. A la fin des années 1900, l'amélioration des conditions d'hygiène et les conditions sanitaires de la nourriture ainsi que la baisse de la mortalité infantile ont permis d'atteindre une durée de vie moyenne de l'ordre de 80 ans (Pour une revue : (Licastro et al., 2005; Troen, 2003; Vasto et al., 2007)).

Cette évolution a entraîné l'augmentation du nombre de patients atteints de pathologies liées à l'âge comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Il s'avère donc de plus en plus nécessaire de comprendre les mécanismes qui régissent le processus de vieillissement. De nombreuses études ont alors été réalisées sur des organismes modèles tels que le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus*. Étant donné la complexité des manipulations génétiques dans les organismes supérieurs, un autre modèle a également été utilisé, celui de la sénescence répllicative des cellules prolifératives normales en culture. Nous avons choisi de présenter de manière chronologique les données qui ont été acquises depuis les travaux pionniers de Hayflick. Après avoir décrit la sénescence répllicative, nous verrons comment les stress oxydatifs peuvent influencer les mécanismes de sénescence cellulaire. Dans cette introduction, nous nous sommes limités à la revue des travaux concernant la sénescence de cellules de mammifères possédant des capacités prolifératives chez l'adulte.

II. SENESCENCE REPLICATIVE

II.1. Définition

En 1961, L. Hayflick a découvert que des fibroblastes diploïdes humains (FDHs) de poumon maintenus en culture présentent une capacité de division limitée. L'évolution de la culture cellulaire peut se diviser en trois phases (figure 1) : la phase I se situe entre la mise en culture d'un explant de poumon humain et l'établissement d'une culture primaire, la phase II constitue une phase de prolifération exponentielle de cellules dites « jeunes ». Un ralentissement

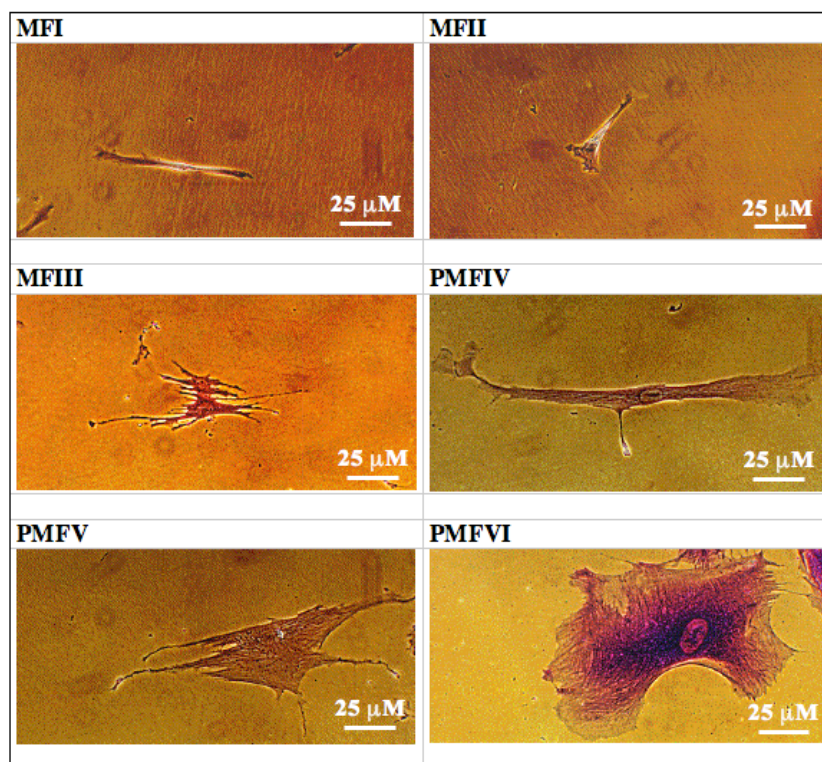


Figure 2 : Microphotographies des différents morphotypes observés dans des cultures de fibroblastes WI-38. Les MFI, MFII et MFIII sont mitotiques tandis que les PMFIV, PMFV, PMFVI sont post-mitotiques. Le morphotype VII est très rarement présent dans des cultures de HDFs et n'est pas représenté (Toussaint *et al.*, 1992).

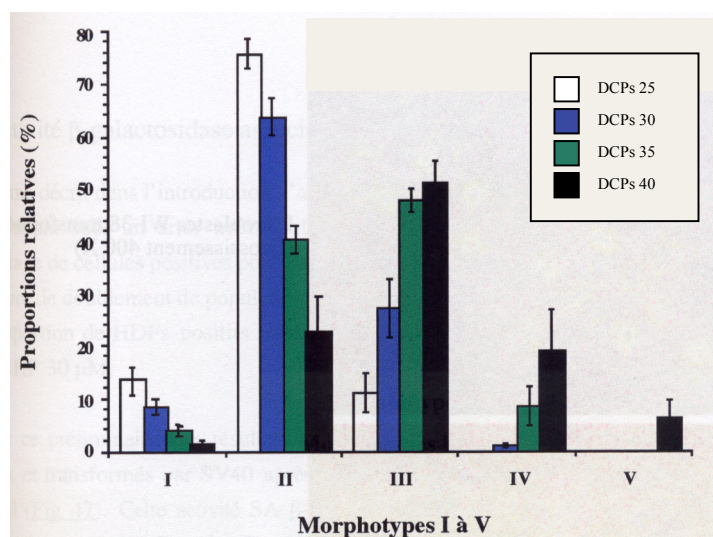


Figure 3 : Evolution des proportions des différents morphotypes I à V au cours des passages en culture des fibroblastes de poumon foetal humain WI-38. Les proportions des morphotypes ont été déterminées aux doublements cumulés de population (DCPs) 25, 30, 35 et 40. Cela représente respectivement 50, 60, 80 et 90 % de la durée de vie proliférative de ces fibroblastes. Les proportions des morphotypes VI et VII ne sont pas présentées car elles constituent un pourcentage infime de la population cellulaire (Dumont, 2001).

de la division cellulaire mène ensuite à la sénescence réplivative. A ce stade, l'arrêt des mitoses est irréversible. Cependant, les cellules dites « vieilles » (Hayflick and Moorhead, 1961), peuvent rester métaboliquement actives pendant plusieurs mois, voir plusieurs années avant de mourir par nécrose. La phase III se caractérise par la baisse croissante du nombre de cellules, ce qui reflète la mort cellulaire par nécrose. Il a été suggéré que la limitation de la durée pendant laquelle des cellules sont capables de se diviser *in vitro* mime les processus ayant lieu lors du vieillissement normal de l'organisme. Cette hypothèse s'est basée sur des observations faites à partir de cellules en culture. Des cellules issues de biopsies d'humains présentaient une capacité proliférative limitée en culture alors que les travaux réalisés précédemment affirmaient le contraire (Dimri et al., 1995; Witkowski, 1987). Le modèle de sénescence réplivative ou « limite de Hayflick » a ensuite été observé pour d'autres types cellulaires tels que des kératinocytes (Rheinwald and Green, 1975), des cellules adrénocorticales (Hornsby and Gill, 1978), des cellules de muscle lisse (Bierman, 1978), des lymphocytes (Tice et al., 1979), des cellules endothéliales (Mueller et al., 1980) ou des chondrocytes (Evans and Georgescu, 1983).

Dans les années 1970, de nombreuses études ont été réalisées pour mieux caractériser la sénescence réplivative d'un point de vue biochimique et morphologique. On a notamment montré que la taille et le nombre des lysosomes est accrue chez les FDHs en sénescence réplivative (Remacle et al., 1980).

II.2. Marqueurs de la sénescence

II.2.A. Morphologie cellulaire

Klaus Bayreuther a proposé, vers la fin des années 1980, que des FDHs de poumon fœtal (Francz et al., 1989) et de peau (Bayreuther et al., 1988) maintenus en culture se différencient spontanément selon 7 stades appelés morphotypes (figure 2). Au cours des doublements de population en culture, les FDHs progressent des morphotypes mitotiques (MF I, MF II et MF III) vers les morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V et PMF VI) avant d'atteindre le morphotype PM VII dit nécrotique (figure 3). Les MF I sont des petites cellules fusiformes et effilées; les MF II sont des petites cellules de forme irrégulière et les MF III sont de plus larges cellules de forme épithélioïde irrégulière. Les PMF IV sont de grandes cellules fusiformes; les PMF V sont arrondis et de très grande taille; les PMF VI sont les cellules les plus larges et les PMF VII présentent une morphologie caractéristique de cellules en dégénérescence qui se détachent de leur support (Bayreuther et al., 1988).

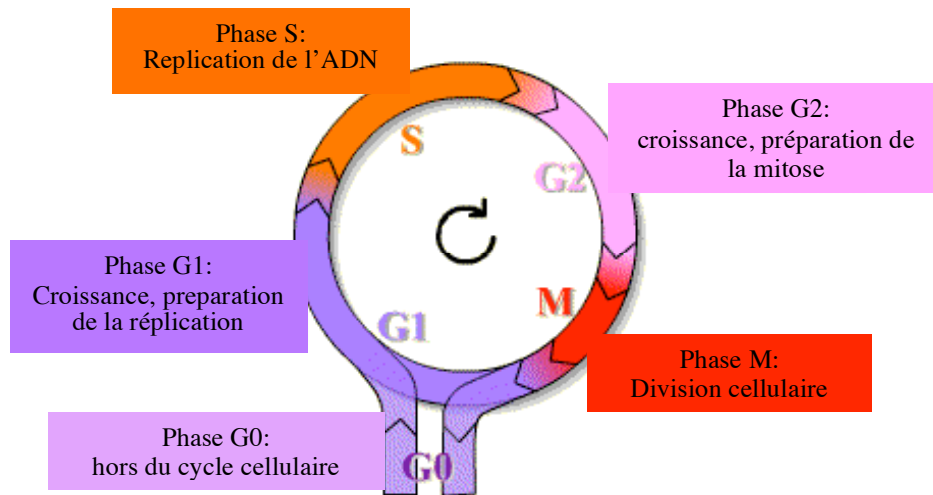


Figure 4: Les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G0. Au cours du cycle, quatre phases se succèdent: G1, S, G2 et M. Les trois premières phases (G1, S, G2) constituent l'interphase, durant laquelle le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire, alors que la phase mitotique (M) est caractérisée par la disparition de cette enveloppe et par l'apparition des chromosomes. Ces derniers deviennent visibles au microscope photonique après leur condensation.

Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en G1, soit entrer en G0, stade quiescent de non division (<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiersBM/cyclecellVIE/index.htm>).

Ainsi, les fibroblastes sénescents sont caractérisés par une augmentation de taille et une augmentation de la taille de leur noyau et nuclei. D'autres caractéristiques morphologiques des cellules sénescents incluent la présence de vacuoles dans le cytosol. De plus, une population de cellules sénescents présente une augmentation du nombre de cellules multi-nuclées. Bayreuther a montré, par utilisation de gels à 2 dimensions, que les profils d'expression protéique des morphotypes mitotiques et post-mitotiques sont différents (Bayreuther et al., 1988).

II.2.B. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence

La β -galactosidase (β -gal) est une hydrolase lysosomale qui présente une activité optimale à pH acide (pH 4-4,5). En 1995, il a été démontré, que, chez des cellules en sénescence répliquative, une activité β -galactosidase est également détectable à pH 6. De plus, au cours de la même étude, une comparaison de biopsies de peau de donneurs d'âges différents a démontré qu'il existe une augmentation de l'activité de la β -gal détectée à pH 6 en fonction de l'âge du donneur. Cette activité associée à la sénescence a été nommée « activité SA β -gal » (« senescence-associated β -galactosidase activity ») (Dimri et al., 1995). Puis, par comparaison de FDHs jeunes et en sénescence répliquative, il a été montré qu'il existe une corrélation positive entre la proportion croissante de cellules présentant l'activité SA β -gal et l'évolution à travers les différents morphotypes décrits ci-dessus (Dumont et al., 2000a). Par la suite, une activité SA β -gal a été détectée dans d'autres types cellulaires sénescents *in vitro* et *in vivo* chez des personnes âgées et cette activité a été utilisée en tant que marqueur de la sénescence (Katakura et al., 1997; Watanabe et al., 1997). Une étude plus récente a mis en évidence l'augmentation du volume lysosomal, déjà découvert antérieurement (Remacle et al., 1980), et a révélé que l'activité SA β -gal est liée à cette augmentation du volume lysosomal et à l'augmentation d'abondance protéique de la β -gal. Cette activité accrue résulte donc de l'activité résiduelle de la β -gal à un pH plus élevé que le pH optimal (Kurz et al., 2000).

Les années 1990 ont vu la découverte de mécanismes expliquant partiellement pourquoi les cellules arrêtent de se diviser lors de la sénescence répliquative. Nous allons les passer en revue.

II.2.C. Arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S

Avant d'expliquer ces mécanismes, rappelons brièvement et schématiquement les différentes étapes et régulations principales du cycle cellulaire.

a. Le cycle cellulaire

Quatre étapes se succèdent au cours du cycle cellulaire (figure 4) :

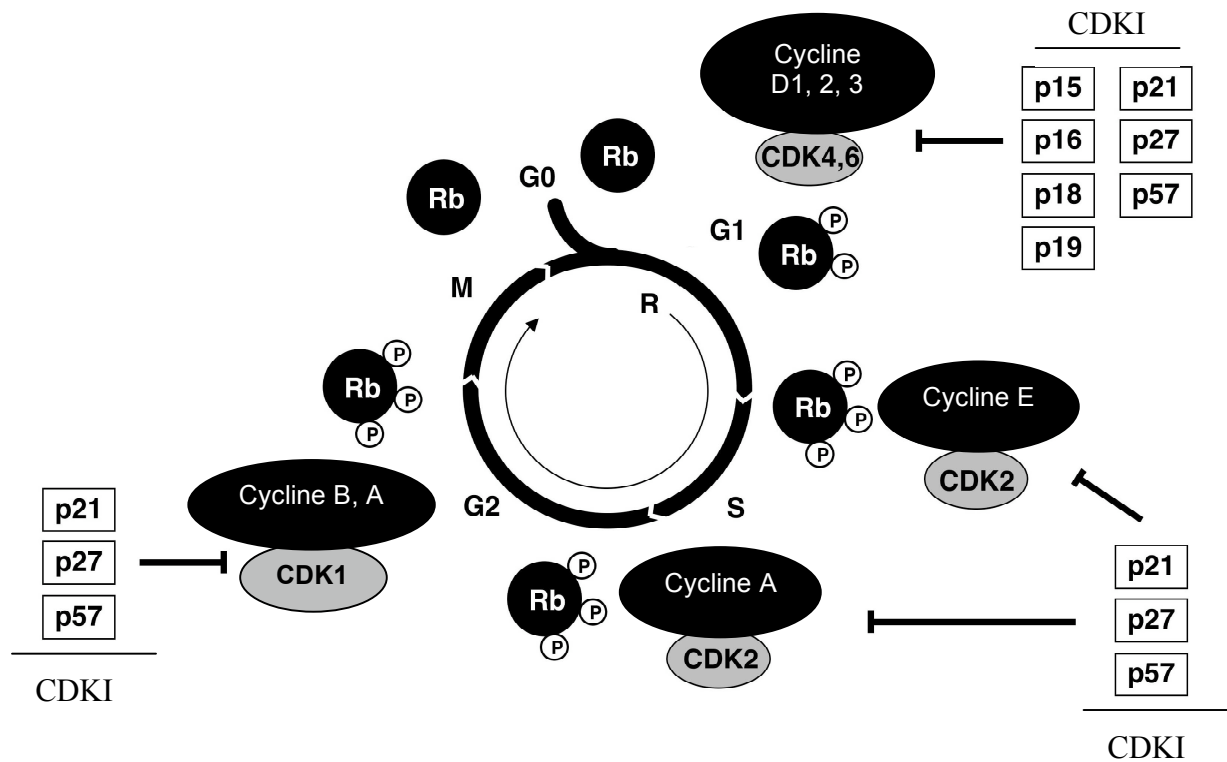


Figure 5: Régulation du cycle cellulaire. Illustration de l'implication temporelle des différents complexes cycline-CDK et des CDKI au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Rb est phosphorylée à partir du milieu de la phase G1 par les complexes CDK4/6-cycline D. Grâce à cette phosphorylation, le point de restriction (R) est franchi. Cette phosphorylation de Rb est maintenue jusqu'en phase M.

- La phase G1 au cours de laquelle la cellule prépare la réplication de l'ADN.
- La phase S qui correspond à la réplication des chromosomes.
- La phase G2 où se mettent en place les mécanismes nécessaires à la phase mitotique.
- La phase mitotique (M) qui comprend la mitose, au cours de laquelle a lieu la division du noyau et des chromosomes, et la cytokinèse, qui correspond à la division du cytoplasme, ce qui permet d'obtenir deux cellules filles.

En fin de phase G1, le point de restriction R détermine si l'achèvement du cycle cellulaire peut avoir lieu ou pas. Une fois ce point dépassé, plus aucun stimulus n'est nécessaire à la progression du cycle cellulaire (Laskey et al., 1989) ; (Pour une revue : (Stein et al., 2002)). Cependant, des systèmes de contrôle peuvent aussi arrêter le cycle cellulaire, notamment en phase G2.

b. Les kinases dépendantes de cyclines

La famille des protéines appelées CDK (kinases dépendantes de cyclines) sont des sérine/thréonine kinases qui sont régulées à différents niveaux.

Premièrement, les CDK sont activées par liaison à une cycline. Les cyclines possèdent une région commune appelée « cyclin box » responsable de leur liaison aux CDK. Cette liaison permet un changement de conformation permettant l'exposition d'un domaine catalytique et de régions importantes pour la liaison aux substrats. Différents complexes cycline/CDK sont formés et activés au cours des étapes successives du cycle cellulaire en fonction de l'expression séquentielle des cyclines (figure 5). On distingue les cyclines mitotiques (A et B), les cyclines actives en phase G1 (C, D et E) et les cyclines non restreintes à une étape du cycle cellulaire (F, G et H). La progression du cycle cellulaire est dépendante de la transcription, de la localisation et de la dégradation de ces cyclines. La transcription des cyclines est régulée par une machinerie sensible à la transition des différentes phases du cycle cellulaire. Les cyclines mitotiques présentent essentiellement une localisation cytosolique durant l'interphase et sont transportées dans le noyau lors de la transition G2/M. Cette étape est régulée par une séquence NLS (« Nuclear Localisation Sequence ») et par phosphorylation. A la fin de la mitose, les cyclines mitotiques sont couplées à des molécules d'ubiquitine, ce qui entraîne leur dégradation par le protéasome (Pour une revue : (Kitazono et al., 2001)).

Deuxièmement, les kinases activatrices de CDKs (CAK) permettent la phosphorylation d'un résidu thréonine dans la région C-terminale des CDK. Cette modification post-traductionnelle a lieu après le changement de conformation de la CDK induit par liaison à une cycline et est nécessaire à l'activation de la CDK, et donc du complexe cycline/CDK. En effet, la phosphorylation de la CDK par CAK induit un nouveau changement de conformation qui

stabilise le complexe. Chez les vertébrés, la CAK est un complexe cyclineH/CDK7/MAT1 et est localisée dans le noyau. La sous-unité cycline est régulatrice, la sous-unité CDK7 est catalytique et le facteur MAT1 est un facteur d'assemblage (Pour une revue : (Kitazono et al., 2001) ; (Kaldis, 1999)).

Troisièmement, les CDK sont régulées par des inhibiteurs classés selon deux familles décrites ci-dessous : la famille INK4 et la famille KIP (figure 5) (Pour une revue : (Kaldis, 1999)).

c. Les inhibiteurs de complexes cycline/CDK : famille INK4

Chez l'homme, les inhibiteurs de la famille INK4 comprennent p16^{INK-4A}, p15^{INK-4B}, p18^{INK-4C} et p19^{INK-4D} et inhibent les CDK4 et CDK6. p16^{INK-4A}, p15^{INK-4B}, p18^{INK-4C} et p19^{INK-4D} possèdent 4 à 6 domaines ankyrine. Les acides aminés des 4 membres de la famille sont bien conservés, essentiellement au niveau des domaines ankyrine 2 et 3. Peu de distinctions biochimiques ont été observées entre ces 4 protéines de la famille INK4. Il semble que la différence fonctionnelle majeure qui existe entre les différents membres INK4 est associée principalement avec les différents profils d'expression en réponse aux différents signaux externes. Alors que p18^{INK-4C} et p19^{INK-4D} sont fortement exprimés durant le développement et dans certains tissus d'individus adultes, p15^{INK-4B} et p16^{INK-4A} sont plutôt associés aux mécanismes suppresseurs de tumeur (Pour une revue : (Sharpless, 2004)). Les membres de la famille INK4 exercent leur action inhibitrice de deux manières distinctes : soit ils empêchent la liaison de la cycline activatrice, soit ils empêchent l'interaction du complexe cycline/CDK avec son substrat (Hirai et al., 1995). En effet, p16^{INK-4A} inhibe l'association de CDK4 et CDK6 avec la cycline D ou provoque la dissociation du complexe et donc inhibe la phosphorylation de Rb (protéine du rétinoblastome) (Hirai et al., 1995). Ce mécanisme empêche la sortie de la phase G1 et donc l'entrée en phase S. La protéine Rb ainsi que les mécanismes situés en aval de cette protéine sont décrits plus bas dans l'introduction (paragraphe f.). Peu de choses sont connues quant aux signaux responsables de l'expression de p16^{INK-4A}. Une hypothèse est que suite à la réplication de l'ADN, une mauvaise réorganisation de la chromatine permettrait l'induction de p16^{INK-4A} (Beausejour et al., 2003). Dans des cellules HeLa, p21^{WAF-1} permet l'induction de p16^{INK-4A} via le facteur de transcription Sp1 (Xue et al., 2004). Le gène INK4A code pour la protéine p16^{INK-4A} alors que le gène ARF, situé sur le même locus que INK4A, code pour la protéine p14^{ARF} (p19^{ARF} chez la souris, ARF pour « alternative reading frame »). p14^{ARF} permet l'activation de p53 puisqu'elle séquestre Mdm2 (« mouse double minute 2 ») (Pour une revue : (Sharpless, 2004)). Les mécanismes liés à p53 sont expliqués plus loin dans l'introduction (paragraphe e.).

L'expression de p15^{INK-4B} est induite en réponse à une stimulation par le « Transforming Growth Factor-β1 » (TGF-β1), ce qui pourrait expliquer que cette cytokine provoque l'arrêt du cycle de certains types cellulaires. L'expression de p15^{INK-4B} est suivie de son association aux complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 et de l'inhibition de l'activité kinase de ces complexes (Hannon and Beach, 1994). p15^{INK-4B}, comme p16^{INK-4A}, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

Le niveau de p19^{INK-4D} varie durant le cycle cellulaire avec un maximum en phase S (Hirai et al., 1995).

d. Les inhibiteurs de complexes cyclines/CDK : famille KIP

Les inhibiteurs de la famille de KIP/CIP, tel que p21^{WAF-1}, p27^{KIP-1} et p57^{KIP-2} ont un spectre d'activité beaucoup plus large que ceux de la famille INK4 car ces protéines peuvent inhiber tous les complexes cycline/CDK présents en phase G1 mais également le complexe cycline B/CDK1 en phase G2 (Dulic et al., 1994). Ils ont donc été nommés inhibiteurs universels de complexes cycline/CDK.

Contrairement aux membres de la famille INK4, les protéines de la famille KIP/CIP ont une affinité plus importante pour les complexes cycline/CDK que pour les CDKs monomériques (Lees, 1995).

p21^{WAF-1} contient 2 régions fonctionnelles indépendantes. La première est un domaine de liaison et d'inhibition des complexes cycline/CDK, retrouvée également chez p27^{KIP-1} et p57^{KIP-2}, et situé dans la partie amino-terminale de la protéine. La seconde, dans la partie C-terminale, est un domaine unique d'inhibition de la réplication de l'ADN par liaison à PCNA (« proliferating cell nuclear antigen »), une protéine partenaire des ADN-polymérases (Chen et al., 1995; Li et al., 1994; Luo et al., 1995; Waga et al., 1994). p21^{WAF-1} peut inhiber toutes les CDKs connues ayant un rôle en phases G1 et S du cycle cellulaire : CDK2, CDK4 et CDK6 (Harper et al., 1995). Il faut également noter que p21^{WAF-1} permet la stabilisation de l'interaction entre les CDK4 et CDK6 et la cycline D afin de favoriser la formation de complexes actifs chez les cellules prolifératives, ce qui suggère que p21^{WAF-1} peut également jouer un rôle alternatif dans la progression du cycle cellulaire en conditions normales. Il a également été montré que p21^{WAF-1} est induite indépendamment de p53 dans divers tissus durant le développement et chez des souris adultes (Liu et al., 1985; Macleod et al., 1995) ; (Pour une revue : (Gartel and Radhakrishnan, 2005)). Le rôle de p21^{WAF-1} en tant qu'inhibiteur ou en tant que facteur d'assemblage des complexes cycline/CDK semble dépendre de la stoechiométrie des composants présents au sein de ces complexes ainsi que de la concentration et de la localisation subcellulaire de p21^{WAF-1} lui-

même. En effet, l'inhibition de complexes cycline/CDK requiert plusieurs molécules de p21^{WAF-1} (Zhang et al., 1994) ; (Pour une revue : (Gartel and Radhakrishnan, 2005; Weiss, 2003)).

p27^{KIP-1} est constitutivement exprimée dans de nombreux types cellulaires et son abondance protéique augmente pendant la phase G0 pour être diminuée lorsqu'un nouveau cycle cellulaire est entamé. L'abondance de la protéine p27^{KIP-1} et des transcrits correspondants augmentent suite à une stimulation par le TGF-β1 et l'inhibition de contact (Albrecht et al., 1998).

e. La protéine p53

La protéine p53 est un facteur de transcription tétramérique jouant un rôle majeur dans le blocage du cycle cellulaire. En conditions normales, p53 est présente en très faible quantité puisque l'ubiquitine ligase Mdm2 conduit à sa dégradation par le protéasome (Haupt et al., 1997). Lorsque l'ADN est endommagé (par exemple lors de la formation de dimères de pyrimidine cyclobutane ou de photo-produits pyrimidine(6-4)pyromidone après exposition à des rayons UVB ou UVC (ultra-violets B ou C) ou lors du raccourcissement critique des télomères), Mdm2 est séquestrée par d'autres protéines, ce qui réduit la dégradation de p53. Celle-ci est stabilisée et activée par phosphorylation au niveau de son domaine de transactivation par ATM/ATR et Chk1/Chk2, elles-mêmes activées suite aux dommages à l'ADN (d'Adda di Fagagna et al., 2003; May and May, 1999; Wahl and Carr, 2001). p53 exerce alors son rôle de facteur de transcription en reconnaissant sa séquence cible au niveau du promoteur de certains gènes et en induisant leur expression, comme p21^{WAF-1}, ce qui a pour effet final de bloquer le cycle cellulaire via l'hypophosphorylation de Rb (Pour une revue : (Campisi, 1996)) (Drané et al., 2002; Harrington et al., 1998).

f. La protéine du rétinoblastome

Il a été démontré que la mutation des deux allèles du gène codant pour la protéine Rb est suffisante pour entraîner une prolifération anarchique des cellules de l'œil chez l'enfant, conduisant au développement tumoral appelé rétinoblastome (Pour une revue : (Harrington et al., 1998)).

Rb est un inhibiteur du cycle cellulaire et a été définie comme étant une protéine suppresseur de tumeur (Harrington et al., 1998). Au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, Rb est hypophosphorylée et séquestre les facteurs de transcription de la famille E2F (Chellappan et al., 1991; Narita et al., 2003). Ceux-ci sont des facteurs de transcription hétérodimériques formés par l'association d'un membre de la famille E2F (E2F-1, -2, -3, -4, -5) avec un membre de la famille DP (DP-1, -2, -3) (La Thangue, 1994). E2F1 induit l'expression de nombreux gènes codant des

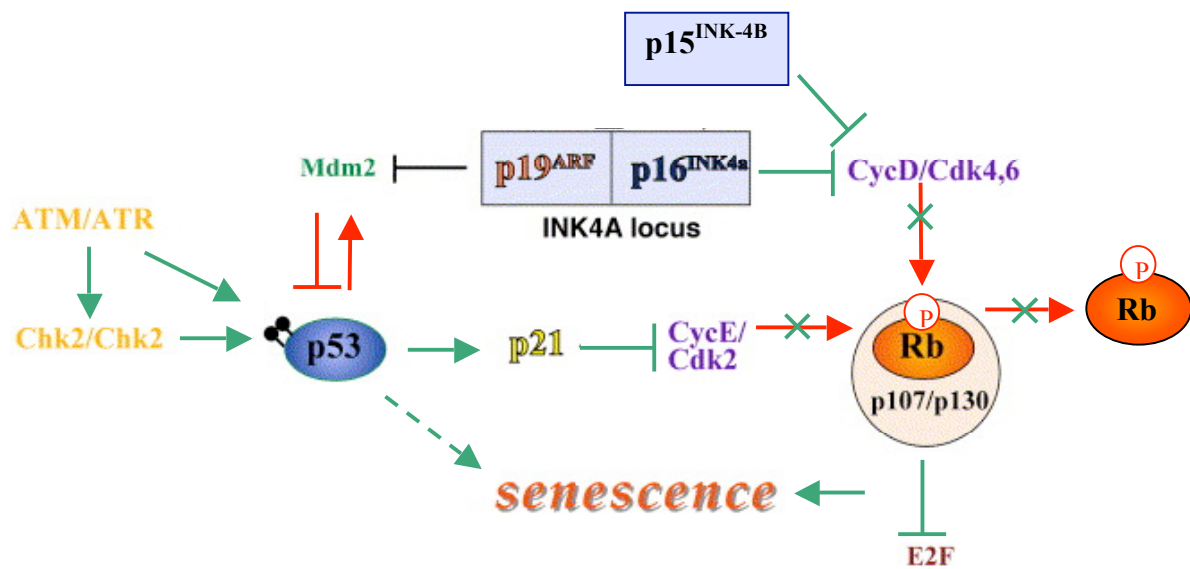


Figure 6: Représentation schématique de l'arrêt de prolifération dirigé par les protéines p53 et Rb. Lors de la sénescence, p53 est activée par phosphorylation par les protéines ATM/ATR et Chk1/Chk2 et par la protéine p19^{ARF} qui séquestre Mdm2. Une fois activée, p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire en surexprimant p21^{WAF-1} et en activant Rb qui séquestre alors le facteur de transcription E2F. p16^{INK4} et p15^{INK-4B} permettent également l'hypophosphorylation de Rb (d'après Ben-Porath *et al.*, 2005).

protéines nécessaires à la phase S du cycle cellulaire (les cyclines A, B, D et E, l'ADN polymérase α , la thymidine kinase, la dihydrofolate réductase, la thymidylate synthétase, etc.). Lorsque E2F1 est lié à Rb, E2F1 ne peut donc plus interagir avec les protéines constituant le complexe de l'ARN polymérase (Farnham et al., 1993) ; (Pour une revue : (Campisi, 1996)). Ceci bloque donc l'activité transcriptionnelle de E2F1 et les cellules sont retenues en phase G1. Lorsque la cellule approche de la transition G1/S, Rb est phosphorylée par le complexe cycline D/CDK (2, 4 ou 6) (Sherr and Roberts, 1999). Rb libère alors E2F1 et la cellule peut poursuivre son cycle cellulaire en entrant en phase S.

g. Mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence répllicative

Lors de la sénescence répllicative, l'arrêt définitif de la division cellulaire a lieu en fin de phase G1, empêchant le passage en phase S. Plusieurs mécanismes entrent en jeu (figure 6). Les dommages à l'ADN induisent l'inactivation de Mdm2. p53 est activée et permet l'expression de p21^{WAF-1} qui inhibe alors le complexe cycline D/CDK (2, 4 ou 6) et cycline E/CDK2 (Atadja et al., 1995; Kulju and Lehman, 1995; Wong and Riabowol, 1996). Le pic de surexpression de p21^{WAF-1} est atteint avant l'entrée en sénescence, c'est-à-dire lors des derniers doublements de populations (Mazars and Jat, 1997). Une fois la sénescence installée, l'abondance protéique de p21^{WAF-1} diminue. Cependant, la transcription et la traduction de p16^{INK-4A} augmentent à ce moment. p16^{INK-4A} prend ainsi le relais de p21^{WAF-1} quant au blocage du cycle cellulaire (Alcorta et al., 1996). Les mécanismes qui permettent l'induction de p16^{INK-4A} sont peu connus. Une étude récente qui a utilisé pour modèle des FDHs surexprimant p16^{INK-4A} propose que p16^{INK-4A} non liée aux CDK4 et CDK6 pourrait induire la traduction de p21^{WAF-1}. Ils suggèrent que l'effet de p21^{WAF-1} sur p16^{INK-4A} est antérieur à l'effet de p16^{INK-4A} sur p21^{WAF-1} (Han et al., 2007).

p16^{INK-4A} bloque les complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 (Pour une revue : (Campisi, 1996)) ; (Krishnamurthy et al., 2006; Rheinwald et al., 2002). Rb hypophosphorylée lie E2F1 et bloque donc la progression du cycle cellulaire (Pour une revue : (Shay and Wright, 2000)). Le fait que p16^{INK-4A}, et non p21^{WAF-1}, soit la protéine qui maintient l'arrêt à long terme de la prolifération expliquerait pourquoi le gène codant p16^{INK-4A} est souvent trouvé muté dans différents types de tumeur alors que cela est rarement le cas de p21^{WAF-1} (Brugarolas et al., 1995; Serrano et al., 1996).

Il est démontré que p15^{INK-4B} est surexprimée lors de la sénescence répllicative *in vitro* des lymphocytes T humains (Erickson et al., 1998). La surexpression de p15^{INK-4B} dans des lignées immortelles provoque un arrêt de la prolifération par inhibition des complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 (Fuxe et al., 2000).

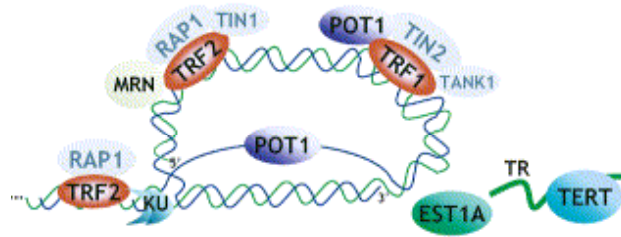


Figure 7 : Composition des télomères chez l'homme. La télomérase (TERT et TR sont respectivement la sous-unité catalytique et ARN de la télomérase sur ce schéma) reconnaît les télomères et permet l'élongation de ceux-ci. De plus, TRF1 et TRF2, qui lient spécifiquement les doubles brins télomériques, constituent des plates-formes pour recruter d'autres protéines nécessaires à la protection et la régulation des télomères. Les protéines représentées en couleur jouent un rôle de coiffe. Les protéines représentées en gris sont impliquées dans la régulation de la longueur des télomères. Néanmoins, les protéines interagissant avec les protéines de coiffe pourraient également jouer ce rôle. Chez l'homme, les télomères se présentent sous forme d'une boucle dans laquelle l'ADN double brin s'enroule, permettant ainsi à l'extrémité 3' de se cacher en envahissant les répétitions télomériques internes. Si une structure différente est adoptée par le télomère, la protéine POT1, liée au simple brin sur le schéma, pourrait lier l'extrémité 3' et par sa fonction, empêcher une dégradation rapide des télomères (Godinho *et al.*, 2004).

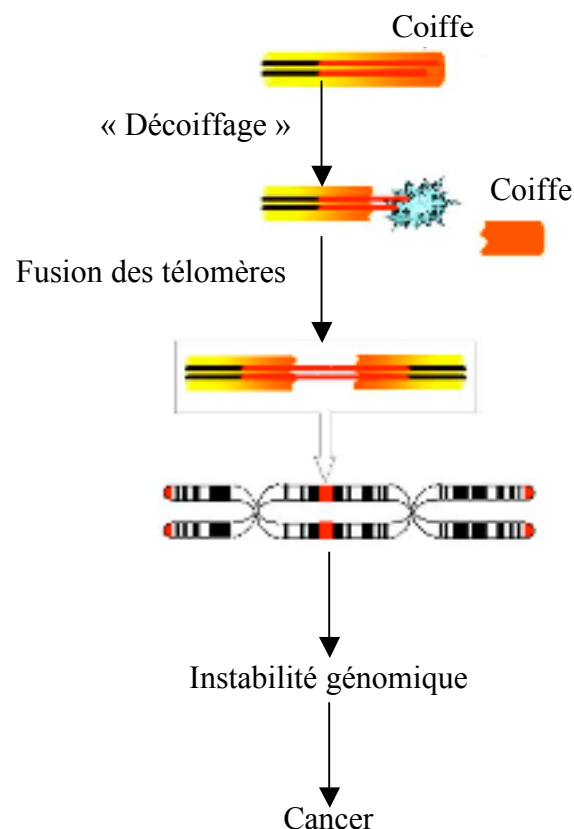


Figure 8 : Modèle de dysfonctionnement télomérique conduisant à l'instabilité génomique. Lorsque la fonction des télomères est compromise par une perte de coiffe des télomères, ceux-ci sont reconnus par le système de réparation de l'ADN et qui engendre la fusion des extrémités chromosomiques. Cette fusion télomérique entraîne alors une instabilité génomique. Cette instabilité génomique conduit à une mauvaise régulation des gènes impliqués notamment dans le contrôle de la prolifération (d'après Gilley *et al.*, 2005).

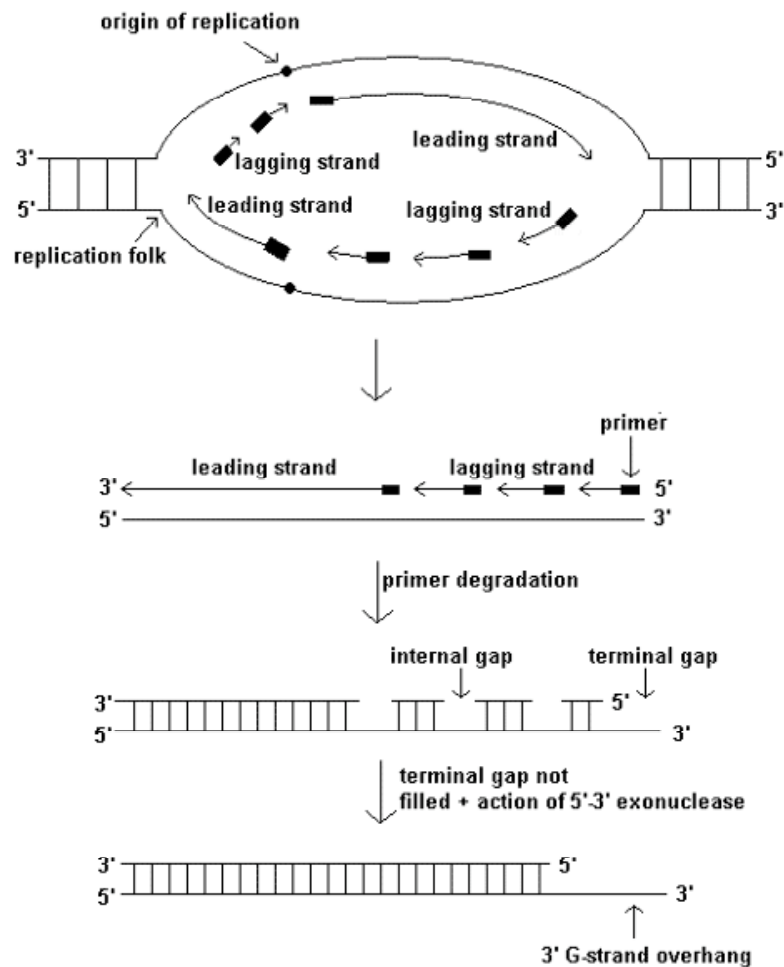


Figure 9 : Mécanismes de raccourcissement des télomères. Durant la réplication, l'un des deux brins d'ADN est synthétisé de manière discontinue par petits fragments (fragments d'Okazaki). Cette synthèse nécessite des amorces d'ARN. Les amorces sont ensuite dégradées et les espaces vides sont comblés par des désoxyribonucléotides. Seul un espace vide subsiste à l'extrémité 5'. Il en résulte un raccourcissement de l'extrémité du chromosome (http://www.medscape.com/viewarticle/482667_2).

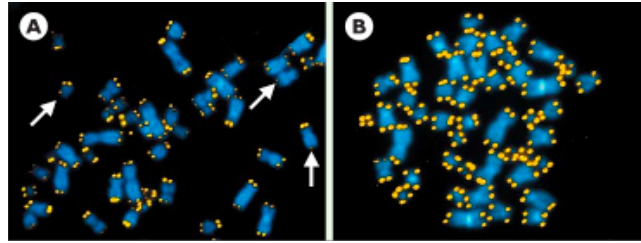


Figure 10: Les télomères sont formés de séquences répétitives TTAGGG localisées aux extrémités des chromosomes. Afin de vérifier que le raccourcissement télomérique est détecté par la cellule en tant que dommage à l'ADN, la sous-unité catalytique de la télomérase a été introduite dans des fibroblastes humains normaux. Les longueurs de ces séquences peuvent être quantifiées par hybridation *in situ* de chromosomes en métaphase. Les sondes PNA (peptide nucleic acid) utilisées sont complémentaires aux séquences TTAGGG et marquées par le fluorochrome Cy-3 (points jaunes). Les chromosomes sont, quant à eux, visualisés par DAPI (en bleu). La longueur des télomères est proportionnelle à l'intensité du signal fluorescent. Des chromosomes en métaphase provenant de lymphocytes T humains surexprimant (B) ou non (A) la sous-unité catalytique hTERT (télomérase) ont ainsi été analysés. La télomérase est une enzyme capable de synthétiser les répétitions de séquences aux extrémités 3'. Elle est composée d'un ARN (qui sert de matrice pour la synthèse de séquences télomériques) et d'une sous-unité catalytique. Des télomères extrêmement courts sont observés sur les chromosomes des lymphocytes T pré-sénescents ne contenant pas le gène hTERT (A). En revanche, la fluorescence des télomères est homogène et intense sur les chromosomes provenant de lymphocytes surexprimant hTERT (B). Ces expériences montrent que l'introduction de la télomérase dans des clones de lymphocytes T permet l'élongation des télomères les plus courts (Rufer *et al.*, 2003).

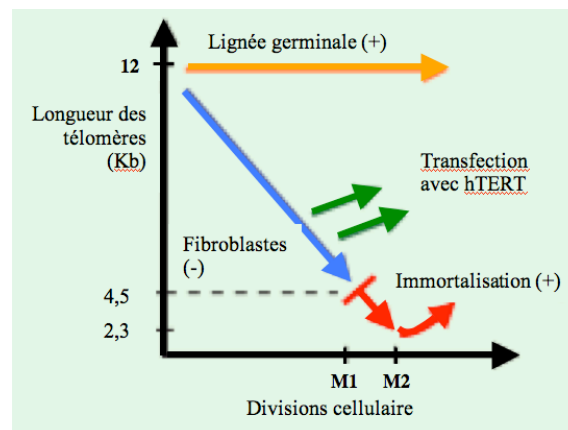


Figure 11 : Les télomères comme horloge mitotique. La télomérase est active (+) dans les lignées germinales et maintient constante la longueur des télomères. En revanche, les tissus somatiques inactivent la télomérase (-), ce qui engendre un raccourcissement progressif de leurs télomères jusqu'à l'arrêt de réplication ou sénescence en M1 (flèche bleue). Les oncoprotéines telles que l'antigène grand T du virus SV40 peuvent neutraliser les protéines p53 et pRb, responsables de l'arrêt au point de contrôle M1, et permettent aux cellules de poursuivre leur prolifération jusqu'au stade M2 ou «crise». Cette phase est caractérisée par l'instabilité extrême des chromosomes à la suite d'un raccourcissement critique des télomères et, en conséquence, par la mort cellulaire. De rares clones malins échappent à ce stade en exprimant la télomérase (+, flèche rouge). L'introduction de la sous-unité catalytique hTERT dans les cellules somatiques permet parfois à elle seule une élongation des télomères et l'immortalisation des cellules (flèche verte) (d'après Rufer *et al.*, 2003).

Lorsque p19^{INK-4D} est surexprimée dans des FDHs de poumon foetal WI-38, le niveau d'expression des protéines p53 et p21^{WAF-1} est fortement augmenté et la progression du cycle cellulaire est bloquée en phase G1, ce qui induit l'apparition du phénotype sénescence (Bai et al., 2007).

L'établissement de la sénescence répliquative est donc un processus en plusieurs étapes qui nécessite l'expression, tour à tour, de plusieurs inhibiteurs de prolifération, avec des différences notables d'un type cellulaire à l'autre. Le raccourcissement télomérique qui a lieu lors de chaque division de cellules normales est à l'origine de la sénescence répliquative.

II.2.D. Le raccourcissement des télomères

Chez tous les eucaryotes, les télomères sont composés d'éléments nucléotidiques répétitifs placés en tandem dans la région terminale de chaque chromosome. Chez l'homme et les autres vertébrés, l'unité fondamentale de ces éléments est la séquence « TTAGGG ». Des protéines sont associées aux télomères, formant ainsi des structures spécialisées qui protègent les extrémités des chromosomes en évitant leur fusion (figure 7 et 8) (Pour une revue : (Ferreira et al., 2004; Gilley et al., 2005)). L'homme possède 46 chromosomes et donc 92 télomères. La machinerie de répliquaison est incapable de compléter les extrémités des chromosomes, ce qui engendre une perte de 50 à 200 nucléotides à chaque duplication de l'ADN (figure 9). Une corrélation entre raccourcissement télomérique et sénescence répliquative a été établie au début des années 1990 (Harley et al., 1990).

La télomérase est active chez les cellules souches (embryonnaires ou somatiques) et maintient les télomères à une longueur de 15 Kb. En revanche, elle n'est pas active dans les tissus somatiques humains, où la longueur des télomères est significativement plus courte.

Le raccourcissement télomérique est détecté par la cellule en tant que dommage à l'ADN, ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Les télomères ont été définis comme étant « l'horloge biologique » de la cellule, puisqu'ils lui permettent de déterminer si elle peut encore se diviser (figure 10 et 11) (Bodnar et al., 1998; Rufer and Nabholz, 2003). D'autres études suggèrent que la sénescence répliquative est induite par un changement de l'état « protégé » des télomères courts plutôt que par une perte complète de l'ADN télomérique (Karlseder et al., 2002).

Au final, il semble donc que de façon générale, la longueur et la structure des télomères ainsi que le complexe multi-protéique qui y est associé interviennent dans la limitation de la capacité répliquative des cellules en culture.

Cells	Known genes			Novel gene tags	EDD bands	Total EDD bands
Young IMR90	0			3	9	12
Young IMR90/BJ	6	collagen 1, pro α 2 collagen 3, pro α 1 (14 \times) collagen 1, pro α 1 (2 \times)	laminin A EST06636 EST07136 (2 \times)	10	16	32
Young BJ	5	aldehyde dehydrogenase glutamate receptor 80K-L protein	osteonectin EST04288	2	13	20
Old IMR90	5	lipoprotein-associated coagulation inhibitor hematopoetic proteoglycan CD44	tPA (3 \times) HSCDN7 (EST sequence)	6	13	24
Old IMR90/BJ	6	tPA (2 \times) TIMP-2 human tissue factor	(EST) IB568 heregulin mitochondrial RNA	7	15	28
Old BJ	5	IGF binding protein 5 PAI-2 (uPAI) interferon gamma (2 \times)	MnSOD EST00718 (2 \times)	9	18	32
Total	27			37	84	148

Direct DNA sequencing and data base analysis identified both known genes and novel genetags, while many EDD bands await cloning and sequence analysis (EDD bands).

Figure 12 : Liste des transcrits identifiés au cours d'une étude basée sur l'utilisation du « differential display RT-PCR » et visant à comparer des FDHs IMR-90 jeunes et en sénescence répliquative (Linskens *et al.*, 1995).

cDNA-Encoded gene	tsa8 39.5°C/33°C	REFs Old/young
Senescence-induced		
SGP-2/ApoJ	27.3	24.0
α 1-procollagen	9.6	5.5
Osteonectin	2.9	5.1
Fibronectin	14.0	4.3
SM22	3.9	3.2
Cytochrome C oxidase	5.3	3.1
SS9	2.8	2.5
GTP- α	1.9	2.1
Laminin receptor	1.4	1.1
Ribosomal L12	1.6	ND
Senescence-repressed		
FRS-2	0.6	0.4
Enolase- α	0.6	1.0
PS16	0.8	ND

Figure 13 : Liste des transcrits identifiés au cours d'une étude basée sur l'utilisation de l'hybridation soustractive et visant à comparer des fibroblastes immortalisés (tsa8) et pour lesquels la sénescence est induite par l'inactivation de l'antigène SV40. La sénescence des fibroblastes tsa8 est induite par l'incubation des cellules à 39,5°C durant 72 h. L'abondance des transcrits est comparée pour des fibroblastes tsa8 placés à 33°C (conditions contrôles) et placés à 39,5°C. Des fibroblastes normaux embryonnaires de rats (REFs) jeunes et âgés sont également utilisés afin de comparer l'abondance des transcrits (Gonos *et al.*, 1998).

II.2.E. Altération du génome mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique codé par un ADN circulaire double brin d'environ 16,5 Kb. Ce génome est présent en de nombreuses copies au sein du réseau dynamique des mitochondries et code pour des protéines exclusivement impliquées dans la production en ATP. Au cours du vieillissement, des délétions, mutations ou modifications des nucléotides altèrent le génome mitochondrial et contribuent à réduire la capacité de synthèse de l'ATP par la chaîne respiratoire. Environ 150 délétions de l'ADN mitochondrial sont connues. Une délétion de 4,9 Kb est observée le plus fréquemment *in vivo* dans une variété de tissus durant le vieillissement humain, de singes ou de rongeurs (Lee et al., 1997). Cette fréquence augmente également avec le nombre de doublings de population de FDHs cultivés *in vitro* (Dumont et al., 2000b). Il a été par ailleurs démontré que des souris exprimant une ADN polymérase mitochondriale dont la sous-unité catalytique a été mutée présentent un nombre plus élevé de mutations et de délétions au sein de l'ADN mitochondrial. Ceci est associé avec une durée de vie réduite et l'apparition prématurée d'un phénotype associé au vieillissement (perte de poids, réduction de la graisse sous-cutanée, alopecie, cyphose, ostéoporose, anémie, fertilité réduite et grossissement du coeur). Cette étude fournit donc un lien de cause à effet entre les mutations qui ont lieu au sein de l'ADN mitochondrial et le phénotype du vieillissement chez les mammifères (Trifunovic et al., 2004).

II.2.F. Modulation de l'expression génique et protéique lors de la sénescence répllicative

Des améliorations technologiques successives ont permis de réaliser des études à grande échelle sur les cellules en sénescence. Ces approches ont ciblé l'analyse du transcriptome, constitué par l'ensemble des ARNm présents dans une population cellulaire et dans des conditions données, ou l'analyse du protéome, représentant l'ensemble des protéines présentes dans cette population cellulaire. Dans les paragraphes suivants, nous présentons brièvement les résultats de quelques études réalisées dans le cadre de la sénescence répllicative. Le principe général des différentes techniques citées ci-dessous est présenté de manière synthétique au paragraphe V (page 44) en fin d'introduction.

a. Etudes transcriptomiques en sénescence répllicative

Le « differential display RT-PCR » a été utilisé pour identifier des gènes différentiellement exprimés chez des FDHs IMR-90 jeunes et sénescents (figure 12). Parmi les 168 variations observées, 84 gènes ont été séquencés et correspondaient à 37 gènes inconnus à l'époque et 27

gènes déjà connus. La confirmation de 23 variations d'abondance a été réalisée par utilisation de la technique du « northern blot » (Linskens et al., 1995).

La sénescence répllicative a également été étudiée pour des fibroblastes embryonnaires de rats transfectés avec l'antigène T thermosensible du virus SV40 et présentant une capacité de prolifération illimitée à la température de 33 °C (Gonos et al., 1998). Une augmentation de température à 37,5 °C, inactivant l'antigène T, induit un arrêt de prolifération irréversible de ces cellules. L'utilisation de l'hybridation soustractive a permis d'identifier 8 gènes induits et 1 gène réprimé lors de la sénescence répllicative de ces fibroblastes (figure 13).

Voici une description brève de certaines des protéines correspondant aux transcrits dont l'abondance est augmentée lors de la sénescence répllicative de fibroblastes embryonnaires de rats.

- L'ostéonectine

L'ostéonectine contribue au remodelage de la MEC (matrice extra-cellulaire) en induisant l'expression de métalloprotéases comme la gélatinase et la collagénase. De plus, cette protéine inhibe les effets mitogéniques du « platelet-derived growth factor » (PDGF) par sa capacité de liaison directe à ce facteur de prolifération, ce qui peut inhiber l'entrée en phase S de cellules endothéliales et de FDHs (Dumont et al., 2002; Pichler et al., 1996).

- SM22

SM22 (« Smooth muscle 22 ») est abondante dans les cellules musculaires lisses. Elle s'associe aux filaments d'actine ainsi qu'à la fibronectine ; elle pourrait donc intervenir dans le remodelage du cytosquelette (Fu et al., 2000; Muller et al., 2007).

- La fibronectine et l' α -1-procollagène

La fibronectine et l' α -1-procollagène sont des composants essentiels de la MEC et jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette, la migration, la prolifération, l'adhérence et la différenciation cellulaire. La fibronectine est sécrétée par les fibroblastes et certaines cellules épithéliales. Elle interviendrait dans les changements morphologiques observés lors de la sénescence répllicative (Garcia et al., 1999; Kumazaki et al., 1993).

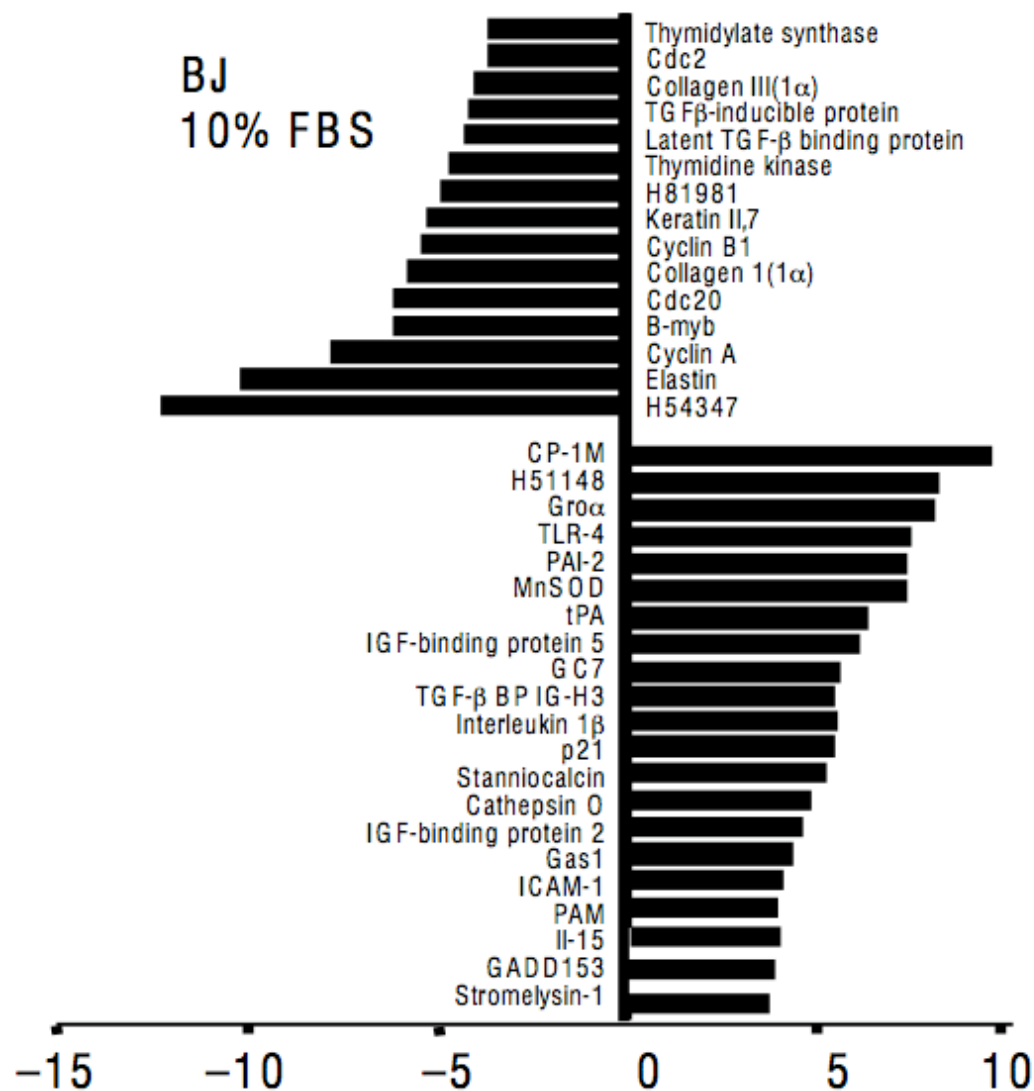


Figure 14 : Liste des transcrits identifiés au cours d'une étude basée sur l'utilisation des micro-damiers à ARN et visant à comparer des FDHs de derme (BJ) jeunes et en sénescence répliative. Les valeurs négatives et positives représentent des transcrits respectivement moins et plus abondants (nombre de fois) dans les cellules en sénescences répliative comparées aux cellules jeunes (Shelton *et al.*, 1999).

Abbreviations	GenBank	Name	Function	Δ ADD RT-PCR	Δ Array	Δ Real-time RT-PCR
APOJ	NM_001831	ApolipoproteinJ	Stress Response		1.8 ± 0.2	2.7 ± 0.4
APOL	NM_003661	Apolipoprotein L	Lipid metabolism	UP	UP	14.6 ± 1.3
AUP1	NM_012103	Ancient ubiquitous protein 1	Signal Transduction		1.9 ± 0.3	2.4 ± 0.4
BIRC6	NM_016252	Baculoviral IAP repeat-containing 6 (apollon)	Apoptosis (-)	UP	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1
CAV1	NM_001753	caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	Transport		2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.6
EEF1A1L14	NM_001403	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1-like 14	Translation	UP	1.8 ± 0.1	
ES1	NM_004649	Mitochondrial precursor ES1	Mitochondrial protein precursor	UP	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.2
FN1	NM_002026	Fibronectin	Extracellular matrix		1.7 ± 0.1	
FTL	NM_000146	Ferritin, light polypeptide	Cell homeostasis		1.6 ± 0.1	2.4 ± 0.2
IGFBP3	NM_000598	Insulin-like growth factor binding proteins	Cytokines and growth factors	UP	2.6 ± 0.2	4.1 ± 0.3
KDELRL1	NM_006801	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	Intracellular protein traffic	UP	1.7 ± 0.2	
KPNB1	NM_002265	Karyopherin (importin) beta 1	Intracellular protein traffic	UP	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1
LOXL2	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	Extracellular matrix	UP	2.3 ± 0.4	3.2 ± 0.7
LRP1	NM_002332	Low-density lipoprotein-related protein 1	Receptor	UP	1.7 ± 0.3	
OSTEO	NM_003118	Osteonectin	Extracellular matrix		1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.3
PABPC1	NM_002568	Poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1	RNA processing	UP	1.9 ± 0.3	
14-3-3-ZETA	NM_003406	14-3-3-ZETA	Signal Transduction	UP	2.1 ± 0.3	
PTEN	NM_000314	Phosphatase and tensin homolog (tumor suppressor)	Cell cycle	UP	2.1 ± 0.3	5.1 ± 0.7
S100A4	NM_002961	S100 calcium binding protein A4	Calcium binding		2.0 ± 0.3	
TFR	NM_003234	Transferrin receptor	Transport		1.9 ± 0.1	5.7 ± 0.9
TGFβ1	NM_000660	TGF-beta1	Cytokines and growth factors		1.5 ± 0.1	2.0 ± 0.3
TMSB10	NM_021103	Thymosin beta 10	Cytoskeleton	UP	1.6 ± 0.3	
ARPC2	NM_005731	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2 34kD	Cytoskeleton	DOWN	-2.1 ± 0.3	
HARC	NM_017913	Hsp90-associating relative of Cdc37	Chaperone	DOWN	-2.8 ± 0.3	
PHGDH	NM_006623	Phosphoglycerate dehydrogenase	Serine biosynthesis	DOWN	-3.3 ± 0.3	
<i>ADAT1</i>	<i>NM_012091</i>	<i>Adenosine deaminase, t-RNA specific 1</i>	<i>RNA processing</i>	<i>DOWN</i>	<i>1.9 ± 0.1</i>	
<i>S100A13</i>	<i>NM_005979</i>	<i>S100 calcium-binding protein A13</i>	<i>Calcium binding</i>	<i>DOWN</i>	<i>2.0 ± 0.4</i>	<i>6.0 ± 0.7</i>

Figure 15 : Liste des transcrits identifiés au cours d'une étude basée sur l'utilisation du « differential display RT-PCR », des micro-damiers à ADN et de la RT-PCR en temps réel et visant à comparer des FDHs WI-38 jeunes et en sénescence répllicative. En italique : faux positifs obtenus avec le « differential display RT-PCR » ; En gras : marqueurs de la sénescence (Pascal *et al.*, 2005).

- L'apolipoprotéine J

L'apolipoprotéine J est une glycoprotéine sécrétée constituée de 2 sous-unités liées par des ponts disulfure. La fonction de l'apolipoprotéine J est encore floue, beaucoup de fonctions hypothétiques lui ont été attribuées. En effet, l'apolipoprotéine J est capable d'interagir avec de nombreuses molécules telles que les lipides ou des protéines hydrophobes (Dumont et al., 2002; Petropoulou et al., 2001). L'apolipoprotéine J peut s'associer à des protéines modifiées suite à un stress afin d'empêcher leur précipitation et peut donc jouer le rôle de protéine-chaperon (Humphreys et al., 1999). De plus, il a été démontré que cette protéine protège les FDHs contre des stress oxydatifs (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Dumont et al., 2002).

Une étude a ensuite été réalisée afin de comparer l'abondance des transcrits de FDHs WI-38 jeunes et en sénescence répllicative. Les auteurs ont mis en évidence une augmentation des transcrits de l'ostéonectine, SM22, la fibronectine, l' α -1-procollagène et l'apolipoprotéine J (Dumont et al., 2000b). Ces cellules en sénescence présentent également une augmentation de l'abondance protéique de l'apolipoprotéine J. La surexpression de cette protéine a permis de déterminer qu'elle n'est pas responsable de l'induction de la sénescence mais est plutôt une conséquence secondaire du phénotype sénescant (Dumont et al., 2002; Petropoulou et al., 2001).

Une étude de la sénescence répllicative par micro-damiers à ARN a comparé l'expression différentielle des transcrits de FDHs de derme (figure 14). Les FDHs présentent une réponse élevée de type inflammatoire, mais il semble que ces caractéristiques de la sénescence répllicative soient dépendantes du type cellulaire (Shelton et al., 1999).

Plus récemment, une étude menée au laboratoire sur la sénescence répllicative de FDHs WI-38 a utilisé la technique du « differential display RT-PCR » et a mis en évidence 147 variations par rapport aux FDHs contrôles (figure 15). Une analyse basée sur les micro-damiers à ADN a permis de mesurer l'abondance des transcrits connus afin d'éliminer les faux positifs générés par le « differential display RT-PCR ». Par la suite certains résultats obtenus par ces deux techniques ont également été confirmés par l'utilisation de la RT-PCR en temps réel (Pascal et al., 2005).

En général, des changements observés au niveau de l'ARNm ne résultent pas toujours en une altération parallèle de l'abondance protéique (Pour une revue : (Park and Prolla, 2005)). Bien que l'étude de l'abondance des transcrits permette de mieux comprendre la régulation de l'expression génique dans des conditions données, cette information n'est pas suffisante. Les

ID, identity number; F.C., -fold change; h, human; m, mouse; r, rat; c, chicken; b, bovine. *, only contaminants such as human keratin were identified.

Up-regulated features				MALDI-MS spot identification	ESI spot identification
ID	MW	pI	F.C. P5 vs. P2		
102	125386	5.48	+3.2	Alanyl-tRNA synthetase (h)	
104	125386	6.37	+2.3		2-Oxoglutarate dehydrogenase precursor (h)
108	124240	6.53	>10	*	O-GlcNAc transferase p110 subunit (r)
110	123105	5.53	>10	105-kDa heat shock protein (m)	
122	114390	5.57	>10	α -Glucosidase II, α subunit (m)	
127	113345	5.82	>10	α -Glucosidase II, α subunit (m)	α -Glucosidase II, α subunit (m)
158	98305	5.01	+2.3		
177	933348	6.52	+2.2	Lysyl hydroxylase isoform 2 (m)	
185	91608	4.96	>10	Heat shock protein 90- α (h)	
190	91608	5.66	+4.8		Gelsolin (h and m) + myosin heavy chain (c)
223	83776	5.31	>10		
248	81062	7.08	>10		
290	74833	6.64	+2.0	Transferrin (b)	
369	67881	5.90	>10		
426	64712	6.19	+2.9	Vesicle transport-related protein (RA410) (r)	
493	60767	5.76	+2.0	2-Oxoglutarate dioxygenase γ -butyrobetaine (r)	
495	60767	6.47	+3.3	Chaperonin-containing TCP-1, γ -subunit (m) + TUC-4 (m)	
497	60462	6.06	+2.0	Seryl-tRNA synthetase (h)	Seryl-tRNA synthetase (h) + T complex protein 1, α (r)
504	60158	6.94	+2.2	MPAST1 (m)	MPAST (h) + lamin A or C (r)
677	47888	5.57	+3.0	ERF1 (h) + probable ATP-dependent RNA helicase p47 (r)	
713	45110	5.14	+3.0	Similar to cdc37 (r)	
773	45386	6.54	+3.1	Elongation factor-1- γ (h)	Elongation factor-1- γ (h)
902	40126	6.58	+2.0	Arp2 (h)	Arp2 (h) + hnRNP-E2 (h)
907	40010	5.71	+2.1	26 S proteasome subunit p40.5 (m)	26 S proteasome subunit p40.5 (h)
1075	47888	5.79	+2.0	Isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase (r)	
1076	33986	7.22	2.0	CLP36 (r)	
1093	23343	5.84	>10	Thiol-specific antioxidant (r)	
1095	33385	6.42	+2.0		
1124	32329	5.34	+2.0	*	
1264	25789	6.05	>10	*	
1302	24177	5.58	+3.0	Heat shock 27 protein (r)	
1319	23370	5.57	>10	*	
Down-regulated features				MALDI-MS spot identification	ESI spot identification
ID	MW	pI	F.C. P2 vs. P5		
15	158986	6.38	+2.0	*	
153	79874	4.76	+2.5	Sec23 protein (h) + ischemia-responsive 94-kDa protein (r)	Sec23 protein (h) + ischemia-responsive 94-kDa protein (h) + HSP70 (h)
278	64858	5.09	+3.2	Preimmunoglobulin heavy chain binding protein (r)	
304	63329	6.09	+2.4	TUC-2 (r)	
460	53263	7.39	+2.0	IMP dehydrogenase (m)	
736	39212	6.13	+2.6	30-kDa protein (h)	
863	34304	5.41	+4.7	Tubulin β chain 15 (r)	
882	34172	5.57	+3.9	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (r)	
1054	25301	5.01	+2.0	ρ GDP dissociation inhibitor (b)	ρ GDP dissociation inhibitor (h and b)
1239	14189	5.66	+2.2	Proteasome subunit RC10-II (r)	Proteasome subunit RC10-II (r) + PRx III (r)
1295	24425	5.87	+2.0	PRx IV (r)	
1299	24549	5.78	+2.1		
Features that shift in their migration			pI	MALDI-MS spot identification	ESI spot identification
ID	MW				
331	71199	6.67		Moesin (r)	
332	71199	6.56		Moesin (r) + guanosine 5'-monophosphate synthetase ? (h)	
1117	22014	6.19			
1348	22134	6.20		Proteasome subunit RC10-II (r)	Proteasome subunit RC10-II (r)
1351	22134	6.10			PRx III (r)

Figure 16 : Liste des protéines identifiées au cours d'une étude basée sur l'utilisation des 2DGE et visant à comparer des fibroblastes embryonnaires de rats jeunes et en sénescence répliquative (Benvenuti *et al.*, 2002b).

données sur l'abondance des protéines sont souvent plus informatives. En effet, les protéines représentent les acteurs principaux de la machinerie cellulaire. D'où l'intérêt de réaliser des études protéomiques qui présentent l'avantage d'étudier les produits finaux de l'expression des gènes.

b. Etudes protéomiques en sénescence répllicative

Dans le but d'identifier des protéines éventuellement impliquées dans les mécanismes limitant le potentiel prolifératif des cellules somatiques normales, deux études protéomiques ont été réalisées à partir de fibroblastes embryonnaires de rats (Benvenuti et al., 2002a; Benvenuti et al., 2002b). La première analyse a étudié la sénescence répllicative de ces cellules en réalisant plusieurs doublements de population en culture sériés alors que la seconde a étudié des fibroblastes immortalisés et pour lesquels la sénescence est induite par l'inactivation de l'antigène SV40 rendu thermosensible par des mutations.

En utilisant la coloration des protéines au bleu de Coomassie, l'étude des gels établis à partir de cellules en sénescence répllicative révèle 49 spots dont l'expression est altérée plus de deux fois (figure 16). L'identification de 42 protéines a été possible. Ces protéines sont des constituants du cytosquelette, des protéines de choc thermique, des protéines jouant un rôle dans le métabolisme, ainsi que des protéines impliquées dans le trafic ou la différenciation, dans la synthèse, le « turnover » ou la modification des protéines. Nous pouvons par exemple citer la moesine, qui fait partie de la famille des ERM (ezrine, radixine, moesine), des protéines assurant un lien entre les filaments d'actine corticale et la membrane plasmique (Louvet-Vallee, 2000). La moesine a été identifiée pour deux spots, l'un présentant une augmentation d'intensité et l'autre présentant une baisse d'intensité. Puisque les poids moléculaires de ces spots sont identiques mais que les points isoélectriques sont différents, les auteurs proposent que l'abondance de la moesine ne varie pas lors de la sénescence mais que cette protéine est modifiée. Nous pouvons également citer 4 protéines de choc thermique (HSP) identifiées en tant que protéines plus abondantes (HSP105, HSP90 α et HSP27) ou moins abondante (Sec23) dans les cellules sénescences. Les HSPs protègent les cellules lors de différents types de stress (Fonager et al., 2002). Elles interviennent également en conditions physiologiques normales, par exemple dans le repliement de protéines nouvellement synthétisées et dans l'assemblage ou la dégradation de complexes protéiques. Par exemple, HSP27 voit son abondance protéique augmenter de 3 fois en sénescence. Néanmoins, lors de l'analyse de son abondance protéique totale par Western blot, aucune différence n'a été observée. L'explication la plus probable pour cette divergence de

A

<i>ID</i>	<i>MW</i>	<i>pI</i>	<i>tsa4</i>	<i>tsa8</i>	<i>tsa12</i>	<i>tsa129</i>	<i>SV2</i>	<i>SV4</i>
(A) <i>All cell lines</i>								
61	113722	5.80	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+2.5	+4.1
92	94474	6.50	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+2.1	+1.5
112	92040	5.67	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+1.8	+2.2
161	78807	6.44	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+1.5	+1.8
209	71346	5.96	n.c.	n.c.	n.c.	−4.9	+1.5	+1.6
236	60178	5.97	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+2.1	+3.5
239	68141	5.90	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+1.6	+2.3
295	63742	6.07	−1.5	−1.7	−1.5	−1.6	n.c.	n.c.
309	61908	6.90	+1.5	+1.5	+1.8	+1.8	n.c.	n.c.
340	61124	5.85	−1.5	−1.5	−1.5	−1.5	n.c.	n.c.
352	60276	5.54	n.c.	−1.5	n.c.	n.c.	+2.3	+1.5
408	54970	7.28	+2.1	+1.5	+1.9	+1.6	−1.5	n.c.
448	53548	6.49	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+2.0	+2.0
547	44443	5.34	n.c.	−2.0	n.c.	−1.5	+1.9	+2.6
639	42919	7.01	+1.7	+1.5	+1.6	+1.5	n.c.	n.c.
854	34256	7.19	n.c.	n.c.	+1.8	n.c.	−1.5	−1.5
1009	21696	5.03	n.c.	−1.8	n.c.	n.c.	+2.0	+1.3
(B) <i>Five cell lines</i>								
50	126542	5.49	n.c.	n.c.	−4.3	+1.7	+1.7	+2.8
70	104809	4.92	n.c.	n.c.	n.c.	+1.5	+2.1	+1.7
75	109260	5.31	n.c.	−2.0	+2.0	n.c.	+4.5	+4.3
88	99679	5.20	n.c.	n.c.	+1.6	n.c.	+8.3	+5.5
125	86088	5.20	+1.5	n.c.	n.c.	n.c.	+1.9	+1.5
130	84708	6.00	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	+1.5	n.c.
232	68929	7.01	+2.1	+1.7	+2.1	n.c.	n.c.	n.c.
282	63172	6.37	n.c.	−1.8	n.c.	n.c.	n.c.	+2.9
454	46916	4.89	n.c.	n.c.	n.c.	−2.2	+1.9	n.c.
503	50222	5.59	+2.1	−2.0	n.c.	n.c.	+4.0	+2.5
559	46471	5.62	+1.6	n.c.	n.c.	n.c.	+2.2	+1.8
667	39256	5.69	+1.9	n.c.	n.c.	n.c.	+1.6	+1.7
1060	240995	5.83	+1.5	−1.5	−1.5	−1.5	n.c.	n.c.
(C) <i>Four cell lines</i>								
68	104809	5.26	−1.6	−1.9	+2.1	+2.2	+7.5	+1.6
81	99504	7.15	n.c.	n.c.	+2.1	n.c.	n.c.	+1.9
693	38467	5.18	+2.5	−3.3	+1.5	n.c.	n.c.	n.c.
740	38566	6.02	n.c.	−1.7	−1.7	n.c.	n.c.	n.c.
(D) <i>Three cell lines</i>								
75	102501	6.39	n.c.	+1.8	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
120	88201	7.29	n.c.	+1.8	+3.3	n.c.	−1.6	n.c.
149	81062	6.17	n.c.	n.c.	+1.5	−1.7	n.c.	+1.8
187	68832	7.38	+1.5	+2.0	n.c.	n.c.	−1.8	n.c.
251	66472	5.45	n.c.	n.c.	−2.3	−1.5	+2.8	n.c.
380	58656	6.99	n.c.	n.c.	+1.9	n.c.	n.c.	n.c.
(E) <i>Shift in the migration</i>								
853	34374	6.17	SHIFT	SHIFT	SHIFT	n.c.	n.c.	SHIFT
883	31214	5.72	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	SHIFT	SHIFT
889	30933	5.75	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	SHIFT	SHIFT

B

ID	MW	pI	MALDI-MS spot identity	ESI spot identity
50	126542	5.49	Alanyl-tRNA synthetase	Alanyl-tRNA synthetase + Heat shock protein 105 kDa α 1B
61	113722	5.8	α -glucosidase II	
68	104809	5.26	Non-muscle α -actinin 1	
70	104809	4.92	Isopeptidase T	
75	102501	6.39	Alix	
75	109260	5.31	α -Actinin 4 + Non-muscle α -actinin 1	No MS/MS
81	99504	7.15	Elongation factor 2	
88	99679	5.2	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	
92	94474	6.5	Lysyl hydroxylase isoform 2	
112	92040	5.67	Gelsolin	Gelsolin
120	88201	7.29	DEAD box protein RB	
125	86088	5.2	Eukaryotic polypeptide chain release factor 3	Eukaryotic polypeptide chain release factor 3
130	84708	6.0	Elongation factor G	
149	81062	6.17	CDC47	CDC47
161	78807	6.44	Radixin	Radixin + Merlin
187	68832	7.38		*
209	71346	5.96	Glycl-tRNA synthetase	
232	68929	7.01	Lamin A	
236	60178	5.97	Leukotriene A4 hydrolase	*
239	68141	5.9	Lysyl-tRNA synthetase	Lysyl-tRNA synthetase
251	66472	5.45	Annexin VI	
282	63172	6.37	Lamin A + Neural specific protein CRMP-2	
295	63742	6.07	TUC-2	
309	61908	6.9	Lamin A	
340	61124	5.85	γ -Butyrobetaine, 2-oxoglutarate dioxygenase	
352	60276	5.54	Copine I	Copine I(11) + Chaperonin subunit 8(θ) + T-complex protein 1, ϵ subunit + κ -B motif-binding phosphoprotein
380	58656	6.99	Tyrosyl-tRNA synthetase	
408	54970	7.28	IMP dehydrogenase	
448	53548	6.49	Aspartyl-tRNA synthetase	
454	46916	4.89	ATP synthase β subunit + Class I β -tubulin	ATP synthetase β subunit + Tubulin, β 5 + tubulin, β 2 + vimentin
503	50222	5.59	Eukaryotic polypeptide chain release factor 1 + probable ATP-dependent RNA helicase p47	
547	44443	5.34	Translation initiation factor eIF-4A + Actin β	
559	46471	5.62		*
639	42919	7.01	Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	
667	39256	5.69		Serine proteinase inhibitor mBM2A + Serine protease inhibitor 14 + Serine protease inhibitor 6
693	38467	5.18	Guanine nucleotide-binding protein α subunit	
740	38566	6.02		
853	34374	6.17	Cytosolic malate dehydrogenase	
854	34256	7.19		LIM protein
883	31214	5.72		Hypothetical protein†
889	30933	5.75	PA28 γ subunit	
1009	21696	5.03	Mitotic checkpoint component Mad2	
1060	24095	5.83	Heat shock protein	Heat shock 27 protein

*: no significant hits. †Accession number 8923710

Figure 17 : Liste des protéines identifiées au cours d'une étude basée sur l'utilisation des 2DGE et visant à comparer des fibroblastes immortalisés et pour lesquels la sénescence est induite par l'inactivation de l'antigène SV40 (Benvenuti *et al.*, 2002a).

A : L'analyse a été réalisée pour 4 lignées cellulaires « tsa » (tsa4, tsa8, tsa12, tsa129) ainsi que pour 2 lignées cellulaires contrôles (SV2 et SV4) capables de proliférer à 33°C et à 39,5°C. Les variations reprises dans le tableau correspondent aux variations d'intensité des spots observées au sein d'une même lignée cellulaire placée à 33°C et à 39,5°C.

B : Nom des protéines identifiées par spectrométrie de masse correspondant aux spots du tableau A.

Spot #	Identification	DB #	MW	pI	Ratio RS
N 101	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6	1.5 ± 0.3
I 818	Peroxiredoxin VI	P30041	25	6.3	0.5 ± 0.1
I 684	HSP27	P04792	24	7.8	1.3 ± 0.1
I 660	chloride intracellular channel protein 1	O00299	27	4.9	1.5 ± 0.2
N 472	electron transfer flavoprotein beta-subunit	P38117	28	8.2	1.5 ± 0.2
I 734	BAG-family molecular chaperone regulator	O95816	24	6.2	1.6 ± 0.2
N 389	alpha-actinin isoform (around 20 kDa)	P12814	103	5.2	1.7 ± 0.7
I 727	Peroxiredoxin VI	P30041	25	6.3	1.8 ± 0.3
N 628	lamin C	P02546	65	6.8	1.9 ± 0.3
I 539	alcohol dehydrogenase	P14550	36	6.3	2.0 ± 0.5
I 815	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	2.0 ± 0.6
I 500	creatin kinase BC	P12277	43	5.4	2.1 ± 0.2
N 208	alpha-enolase	P06733	47	7.4	2.0 ± 0.6
N 587	alpha-enolase	P06733	47	7.4	5.5 ± 1.5
I 626	annexin 1	P04083	39	6.6	0.5 ± 0.2
N 623	calmodulin-binding protein	O88482	67	11.3	0.6 ± 0.1
I 256	lamin C	P02546	65	6.8	0.6 ± 0.2
N 464	NADH-cytochrome B5 reductase	P00387	34	7.6	0.6 ± 0.3
I 412	actin	P53493	42	5.3	0.6 ± 0.0
I 342	glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase	P11413	59	6.4	0.7 ± 0.1

Figure 18 : Liste des protéines identifiées au cours d'une étude basée sur l'utilisation des 2DGE et visant à comparer des FDHs WI-38 jeunes et en sénescence répliative (Dierick *et al.*, 2002a).

résultats serait que HSP27 se présente sous différentes isoformes et peut donc être présente dans différents spots sur les 2DGE (gels à deux dimensions).

La seconde étude, portant sur des fibroblastes immortalisés de rats entrant en sénescence après inactivation de l'antigène SV40, et pour laquelle les protéines ont été marquées avec une molécule fluorescente, présente seulement 9 variations d'abondance protéique communes avec celles qui sont observées pour des cellules primaires en sénescence répliquative (figure 17). Aucune de ces 9 protéines n'avait été identifiée précédemment lors d'étude de la sénescence répliquative. HSP27 fait partie de cette liste de 9 protéines communes entre les deux études réalisées indépendamment.

Une étude menée au laboratoire et basée sur la séparation des protéines par 2DGE a comparé le protéome de FDHs WI-38 jeunes et en sénescence répliquative (figure 18) (Dierick et al., 2002a). Les protéines ont été marquées métaboliquement par utilisation de méthionine radioactive [³⁵S]. Les analyses statistiques ont permis de mettre en évidence 50 spots présentant une différence significative d'intensité intégrée entre les deux conditions étudiées parmi les 1.800 spots détectés sur chacun des gels. Parmi ces 50 spots, 34 présentaient une augmentation d'intensité et 16 présentaient une baisse d'intensité. L'identification de 20 protéines a pu être réalisée.

Ainsi, cette étude démontre par exemple que la pyruvate kinase M2 (PKM2) et l'alpha-énolase, deux enzymes impliquées dans la glycolyse, sont surexprimées chez les FDHs sénescents. Une augmentation de l'activité de la glycolyse pourrait compenser, au moins en partie, la baisse de régénération d'ATP par les mitochondries, un phénomène observé avec l'âge (Lanza et al., 2005). Par contre, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) semble être moins abondante chez les FDHs en sénescence répliquative. La G6PD est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates (Ho et al., 2007). Elle catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphoglucono- δ -lactone. Cette réaction est couplée à la réduction d'une molécule de NADP⁺ en NADPH et constitue l'une des sources importantes de ce cofacteur cellulaire. Cette réaction est l'étape limitante de la voie des pentoses phosphates, dont elle contrôle le flux. Une diminution du contenu de cette enzyme favorisait la baisse de consommation de glucose-6-phosphate par la voie des pentoses phosphates, ce qui pourrait compenser la consommation augmentée de ce glucose-6-phosphate par la glycolyse. La peroxyredoxine VI (Prx6) a été identifiée pour deux spots présentant des variations opposées. Il a alors été proposé que ces spots pouvaient correspondre à des isoformes phosphorylées de cette protéine. Des études par Western blot et RT-PCR en temps réel ont ensuite montré respectivement des augmentations d'abondance

Spot no. on gels	Protein	pI experimental (theoretical)	Mass kDa experimental (theoretical)	Corresponding gene and chromosome location	SWISS-PROT/TrEMBL AC	Presence in reference 2-D maps	Z-Score ^{a)}	No. matching peptides	Averaged Δ mass (min-max)	% sequence coverage
1	TCFZ T-complex protein 1, zeta subunit	6.43 (6.2)	61.44 (58.46)	CCT6A or CCT6 or CCT7 7p11.1	P40227		2.3	6	0.074 Da (0.044–0.101)	19
2	PD33 Protein disulfide isomerase	5.64 (5.98)	56.4 (56.78)	PDIA1 15q15	P30101	BDC, CEC, HL60, LYM, PLA	2.3	12	0.190 Da (0.045–0.201)	32
3	PD33 Protein disulfide isomerase	5.75 (6.0)	56.2 (57.18)	PDIA1 15q15	P30101	BDC, CEC, HL60, LYM, PLA	2.32	10	0.043 Da (0.011–0.106)	23
4	CDNA FLJ10849 fis. clone NT2RP4001414, highly similar to septin 2 homolog	6.16 (6.4)	50.6 (49.67)	?	Q9NVA2		2.36	13	0.079 Da (0.020–0.147)	38
5	Unidentified	8.22	47.08							
6	PGK1 Phosphoglycerate kinase 1	7.99 (8.6)	43.8 (45.00)	PGK1 Xq13	P00558		2.41	15	0.027 Da (0.005–0.099)	54
7	Unidentified	6.44	44.7							
8	Unidentified	5.9	37.84							
9	Unidentified	5.23	35.64							
10	CAZ1 F-actin capping protein alpha-subunit	5.46 (5.4)	33.77 (33.08)	CAPZA1 1p36.13–q23.3	P52907		2.17	8	0.059 Da (0.000–0.131)	47
11	ANX1 Annexin 1	6.45 (6.6)	33.46 (38.9)	ANXA1 9q12–q21.2	P04083		2.32	10	0.057 Da (0.016–0.185)	34
12	Unidentified	5.21	33.4							
13	Unidentified	5.37	32.1							
14	RANG Ran-specific GTPase-activating protein	5.15 (5.2)	31.5 (23.74)	RANBP1 22q11.21	P43487		2.10	6	0.037 Da (0.028–0.057)	28
15	Unidentified	5.26	30.97							
16	EF1B Elongation factor 1 β	4.45 (4.5)	30.9 (24.92)	EEF1B1 15	P24534	BDC, CEC, HL60, LYM	2.28	7	0.063 Da (0.008–0.143)	49
17	Unidentified	4.54	30.88							
18	PSE1 Proteasome activator complex subunit 1	5.74 (5.8)	30.05 (28.88)	PSME1 or IF15111 14q11.2	Q06323		2.36	6	0.070 Da (0.019–0.101)	30
19	PSA3 Proteasome subunit alpha type 3	5.15 (5.2)	29.95 (28.64)	PSMA3 or PSMB14q23	P25788			6	0.087 Da (0.011–0.148)	25
20	PM3B Phosphoglycerate mutase	6.89 (6.75)	29.7 (28.67)	PGAM1 10q25.3	P18669		1.66	6	0.145 Da (0.090–0.170)	30
21	PSA5 Proteasome subunit alpha type 5	4.65 (4.7)	28.99 (26.62)		P28066		2.33	7	0.048 Da (0.006–0.130)	35
22	TPIS Triosephosphate isomerase	6.5 (6.5)	28.6 (26.81)	TPIS 12p13	P00938	BDC, HL60	1.91	9	0.076 Da (0.001–0.202)	44
23	TPIS Triosephosphate isomerase	6.96 (6.5)	28.6 (26.81)	TPIS 12p13	P00938	BDC, HL60	2.00	9	0.061 Da (0.003–0.122)	45
24	HS27 Heat shock 27 kDa protein	5.58 (6.0)	28.52 (22.8)	HSPB1 7q	P04792		1.66	4	0.065 Da (0.009–0.116)	26
25	HS27 Heat shock 27 kDa protein	6.06 (6.0)	28.5 (22.8)	HSPB1 7q	P04792		1.80	7	0.057 Da (0.030–0.128)	37
26	UBL1 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	5.42 (5.3)	28.08 (25.15)	UCHL1 4p14	P09936		2.22	8	0.105 Da (0.029–0.144)	45
27	TXM Mitochondrial thioredoxin-dependent peroxide reductase	6.12 (7.1)	26 (28.02)	AOP1 10q26.2–q26.3	P30048	BDC, CEC	1.45	5	0.056 Da (0.004–0.109)	33
28	CATB Catepsin B	5.24 (5.2)	25.9 (22.97)	CTSB 8p22	P07858		1.73	5	0.085 Da (0.020–0.163)	22
29	CATB Catepsin B	5.24 (5.2)	24.57 (22.97)	CTSB 8p22	P07858		1.70	5	0.058 Da (0.028–0.093)	22
30	GTP Glutathione S transferase P	5.54 (5.4)	25.5 (23.43)	GSTP1 11q13	P09211	BDC, CEC, LYM	1.67	6	0.095 Da (0.005–0.207)	45
31	SODM Superoxide dismutase [Mn]	7.21 (6.9)	24.94 (24.88)	SOD2 6q25.3	P04179	BDC, CEC, HL60, LYM	2.15	6	0.080 Da (0.031–0.162)	28
32	Unidentified	4.91	24.42							
33	RNA-binding protein regulatory subunit	6.2 (6.3)	24.27 (20.04)	DJ-1 1	014805		2.24	8	0.031 Da (0.006–0.058)	51
34	ATPQ ATP synthase D chain	5.20 (5.2)	23 (18.53)	ARTPSH ?	0075947		1.84	6	0.037 Da (0.002–0.104)	42
35	SODC Superoxide dismutase [CuZn]	5.8 (5.7)	19.3 (16.15)	SOD1 21q22.1	P00441	BDC, CEC, HL60, PLA	1.95	5	0.039 Da (0.006–0.076)	58
36	COF1 Cofilin, non-muscle isoform	8.16 (8.5)	19.19 (18.7)	CFL1 11q13	P23528		2.37	9	0.191 Da (0.078–0.426)	48

Figure 19 : Liste des protéines identifiées au cours d'une étude basée sur l'utilisation des 2DGE et visant à comparer des fibroblastes immortalisés et pour lesquels la sénescence est induite sous l'inactivation de l'antigène SV40 (Boraldi *et al.*, 2002).

totale de protéine et de transcrits de la Prdx6. La Prx6 est un membre de la famille des protéines antioxydantes spécifiques des thiols (peroxyredoxines). La Prx6 est impliquée dans la régulation du potentiel rédox de la cellule; elle peut réduire l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène), les acides gras, etc. ; et peut jouer un rôle dans la régulation du « turnover » des phospholipides (Manevich and Fisher, 2005). Il a également été montré que la surexpression stable de la Prx6 dans des FDHs WI-38 avant l'exposition de ces cellules à des concentrations sublétales de *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxyde) ou des expositions répétées aux UVB permet d'augmenter la survie cellulaire après ces traitements (Dierick et al., 2003). HSP27 a également été identifiée à partir des 2DGE et une augmentation de l'abondance des transcrits et de la protéine a été mise en évidence respectivement par RT-real-time PCR et par Western blot chez les FDHs WI-38 en sénescence répllicative (Dierick et al., 2002b).

Une autre étude a consisté en la comparaison des protéomes de FDHs de derme de sujet jeunes, adultes ou âgés d'environ 15, 40 et 80 ans, et cultivés *in vitro* (figure 19) (Boraldi et al., 2003). Ce travail était basé sur des 2DGE colorés à l'argent. Ces auteurs montrent que 38 protéines (sur 1.500 protéines détectables dans toutes les conditions) présentent un changement d'abondance lié à l'âge. Les différences majeures ont été observées entre les cellules d'individus jeunes et adultes. La comparaison des individus adultes et vieux révèle seulement quelques différences d'abondance protéique. Les auteurs proposent que le faible nombre de protéines présentant des différences d'abondance entre les trois conditions étudiées est probablement lié à la procédure d'analyse des gels qui vise à éliminer les variabilités individuelles. De plus, les auteurs considèrent seulement les variations significatives d'au moins 3 fois.

Par exemple, l'abondance de l'annexine A1 augmente entre les individus jeunes et adultes puis diminue chez les individus âgés. Un autre exemple parmi les protéines identifiées lors de cette étude est HSP27, qui diminue avec le vieillissement des individus.

Une étude plus récente, basée sur l'utilisation de la technique iTRAQ, a également mis en évidence des variations d'abondance protéique de FDHs WI-38 en sénescence répllicative. Cette procédure d'analyse a permis d'identifier des protéines nucléaires, membranaires, du cytosquelette, du réticulum endoplasmique (RE) ainsi que d'autres protéines du cytosol. Par exemple, il a été montré que le collagène de type I est sous-exprimé chez les FDHs en sénescence répllicative. Le collagène de type I est le constituant de repliement architectural principal nécessaire pour la réparation des tissus. Une relation inverse entre la proportion de FDHs sénescents et la production de collagène pourrait donc réduire la capacité de cicatrisation des tissus. Les auteurs ont étudié les abondances protéiques du collagène de type I, de HSP90 et de la vimentine par Western blot et ont obtenu des résultats comparables à ceux obtenus par

iTRAQ. Dans le futur, cette approche technique pourrait être utilisée pour analyser des fractions sub-cellulaires (Cong et al., 2006).

À ce stade de l'introduction de ce travail, après avoir décrit le modèle de Hayflick, et avoir repris les principales caractéristiques de la sénescence répllicative, nous avons présenté quelques analyses transcriptomiques et protéomiques ayant pour but d'identifier de nouveaux marqueurs de la sénescence.

Plusieurs théories ont été proposées dans la littérature afin d'expliquer les changements observés lors de la sénescence répllicative et du vieillissement. Parmi celles-ci, la théorie des radicaux libres propose qu'une augmentation de la production de radicaux libres et une augmentation des dommages oxydatifs au cours du temps sont en partie responsables du vieillissement biologique (Pour une revue : (Balaban et al., 2005)).

La suite de cette introduction est donc très brièvement consacrée aux espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène et aux stress oxydatifs.

Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS)	
Radicalaires	Non-radicalaires
Superoxyde, $O_2^{\bullet -}$	Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2
Hydroxyle, $\bullet OH$	Acide hypochloreux, $HOCl$
Peroxyle, RO_2^{\bullet}	Ozone, O_3
Alcoxyle, RO^{\bullet}	Oxygène singulet, O_2
Hydroperoxyle, HO_2^{\bullet}	Acide hypobromeux, $HOBr$

Figure 20 : Espèces réactives dérivées de l'oxygène, de l'azote et du chlore produits dans le corps humain. ROS est un terme collectif qui reprend des espèces radicalaires et non radicalaires. Toutes ces espèces ont des réactivités qui varient largement : OH^{\bullet} réagit rapidement (demi-vie de 10^{-9} sec) avec de nombreuses molécules, alors que H_2O_2 est plus stable (demi-vie de 10^{-5} sec) et $O_2^{\bullet -}$ présente une réactivité variable (demi-vie de 10^{-6} sec). RO_2^{\bullet} et RO^{\bullet} ont des réactivités intermédiaires (d'après Evans *et al.*, 2001).

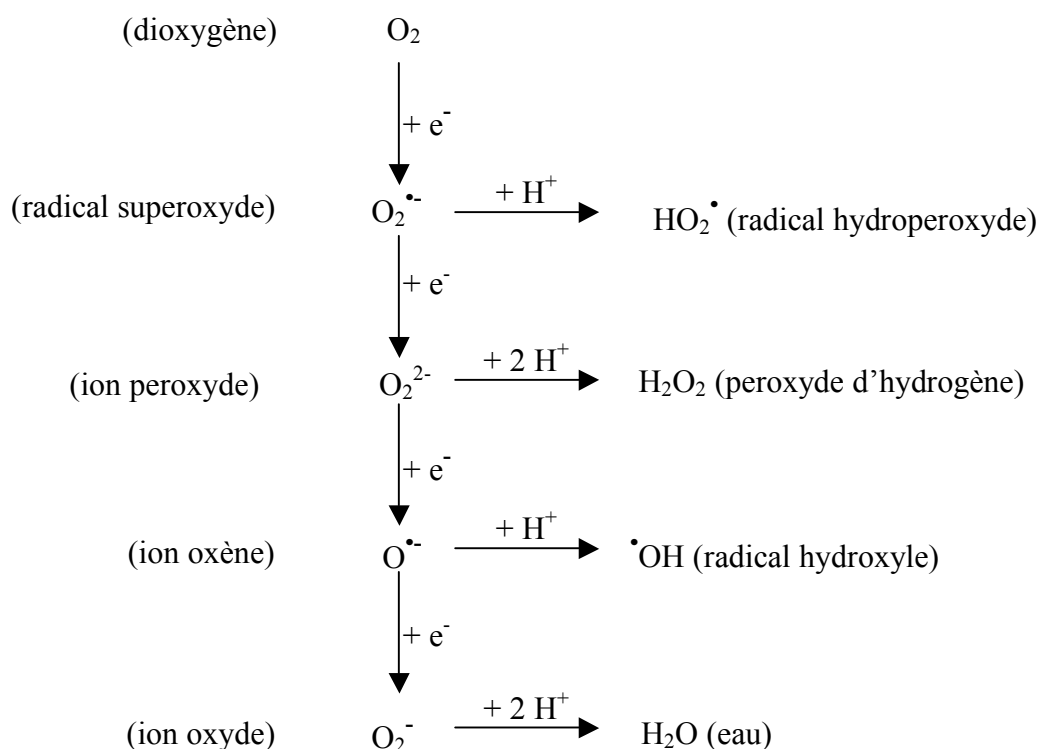


Figure 21 : Description des produits dérivés de la réduction monoélectronique de la molécule d'oxygène en eau (d'après Fridovich, 2001).



Figure 22 : Conversion de l' H_2O_2 en $\cdot\text{OH}$ en présence d'UV ou de métal de transition comme le fer (réaction de Fenton) (d'après Evans *et al.*, 2000).

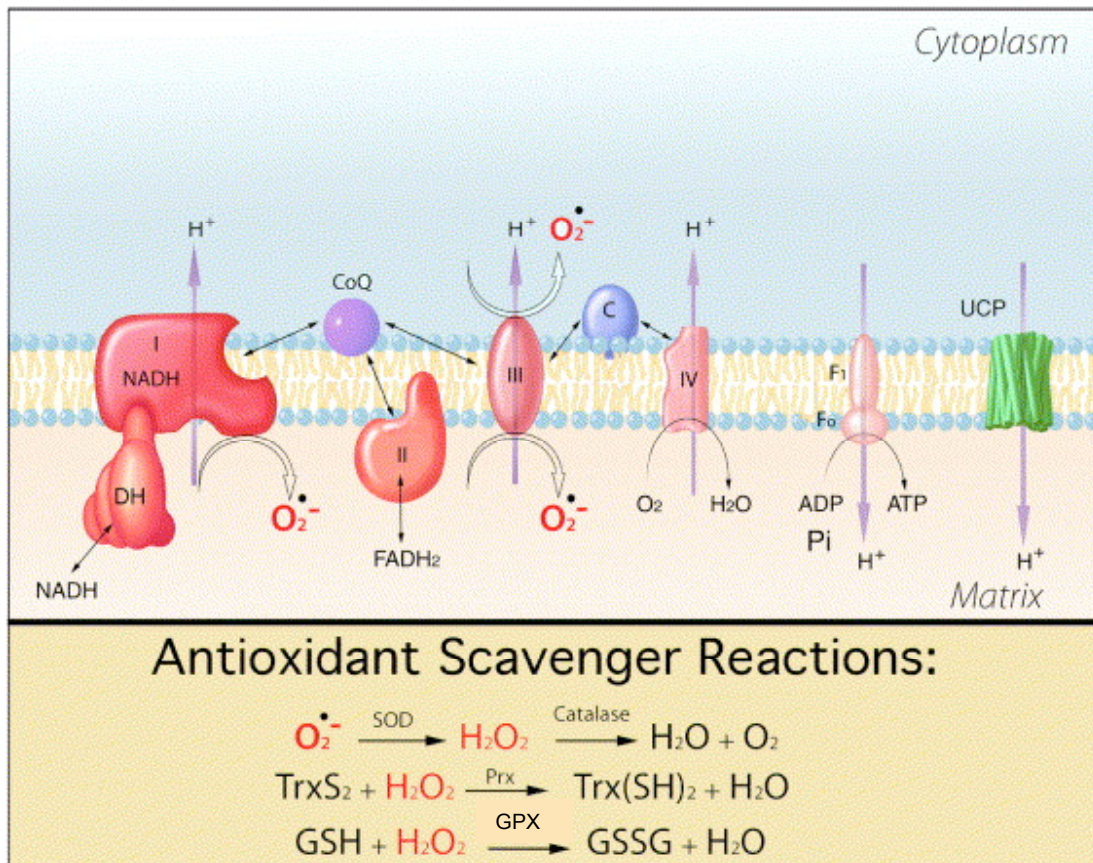


Figure 23 : Modèle schématique de la génération de ROS par la mitochondrie. Les sites I et III sont identifiés comme étant les sites de production majeurs des anions superoxydes parmi les voies principales de production des ROS. Les enzymes antioxydantes comprennent différentes isoformes de peroxiredoxines (Prx), de superoxyde dismutases (SOD), et de glutathion peroxydase (GPX). La réaction catalysée par la famille des peroxiredoxines requiert d'autres protéines tel que la thioredoxine (TrxS2). De même, l'action enzymatique de la GPX requiert du glutathion réduit (GSH). Certains membres de la famille des SOD, GPX et Prx se situent à l'intérieur de la mitochondrie alors que d'autres membres de ces familles se localisent dans le cytosol ou l'espace extra-cellulaire. Le dégradé de couleur rouge aux niveaux des différents sites correspond au potentiel d'oxydo-réduction (rouge, plus élevé ; rose, plus faible). La famille des protéines UCP (« uncoupling protein ») (en vert) réduit le potentiel mitochondrial global de membrane, ce qui entraîne une réduction des ROS formés (Balaban *et al.*, 2005).

III. LES ESPECES REACTIONNELLES DERIVEES DE L'OXYGENE ET STRESS OXYDATIFS

III.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules une très grande réactivité, ce qui rend cet état transitoire (Fridovich, 2001). Ce déséquilibre peut être comblé par l'acceptation d'un autre électron qui vient s'apparier au premier ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.

Parmi les « espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène » (ROS) sont reprises les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) ainsi que les molécules non radicalaires dérivées de l'oxygène tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (O_2^1) (figure 20).

L'ajout des électrons sur l'oxygène moléculaire (O_2) se fait selon une réduction monovalente qui génèrent finalement une molécule d'eau (figure 21).

$O_2^{\cdot-}$ et le OH^{\cdot} sont très instables et réagissent directement avec d'autres molécules au site même où ils ont été formés. Par contre, H_2O_2 a une durée de vie plus longue et est donc plus diffusible. Cependant, H_2O_2 est peu réactif : il peut agir en tant qu'oxydant ou réducteur moyen. Il n'oxyde pas les macromolécules aisément. Le danger de H_2O_2 provient de sa conversion en OH^{\cdot} , par exemple lors de l'exposition aux UV, ou par interaction avec des ions de métaux de transition comme le fer (figure 22) (Evans et al., 2000).

III.2. Site de production des ROS

Tous les organismes vivant dans un environnement aérobie sont exposés continuellement aux ROS. Ceux-ci ont une origine endogène ou exogène.

III.2.A. Les ROS d'origine endogène

H_2O_2 est présent en quantité plus élevée dans les voies respiratoires de patients touchés par une maladie inflammatoire pulmonaire. Par exemple, les symptômes de l'asthme comprennent l'inflammation des voies respiratoires qui induisent l'afflux de leucocytes de la circulation vers les bronches. Une fois activées, ces cellules libèrent des médiateurs et des cytokines qui amplifient le processus inflammatoire, incluant la production de $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . La mesure de H_2O_2

exhalé peut être utilisée comme méthode non-invasive afin de déterminer l'inflammation des voies respiratoires et des stress oxydatifs (Antczak et al., 1997; Loukides et al., 1998; Sznajder et al., 1989). L'inflammation en général génère des ROS (pour une revue : (Kregel and Zhang, 2007)).

Chez les individus sains, les majeures sources intracellulaires de production endogène de ROS sont la mitochondrie, les peroxysomes, les enzymes du cytochrome p450 ou encore les NADPH oxydases (Pour une revue : (Kregel and Zhang, 2007; Lombard et al., 2005)).

a. La mitochondrie

La mitochondrie est la principale source d'ATP pour la survie cellulaire chez les organismes aérobies.

Environ 0,4 à 4 % de l'oxygène consommé par les mitochondries sont convertis en ROS. Ceux-ci représentent approximativement 90 % des ROS intracellulaires. La génération de ROS par la mitochondrie est une conséquence de l'oxydation contrôlée de NADH et FADH₂ pour générer un potentiel électrochimique (protons) de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (figure 23). Ce potentiel électrochimique est ensuite utilisé pour phosphoryler l'ADP grâce à l'ATPase. À divers endroits de la chaîne de transport des électrons, les électrons dérivés du NADH ou du FADH₂ peuvent directement réagir avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons générant ainsi des radicaux libres. Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit donc de faibles quantités de ROS de manière continue (Pour une revue : (Batandier et al., 2002)).

b. Les peroxysomes

Le rôle central des peroxysomes est la participation à de nombreuses voies métaboliques telle que la β -oxydation des acides gras. La majeure source de production de H₂O₂ dans les peroxysomes sont les oxydases, par exemple les Acyls-CoA oxydases, qui transfèrent l'hydrogène de leur substrat sur l'oxygène moléculaire. Les peroxysomes contiennent également des enzymes nécessaires à la dégradation de H₂O₂. Chez les individus âgés, une perturbation de l'équilibre entre les enzymes impliquées dans la production et la dégradation de H₂O₂ est observée. Cette altération peut conduire à la production de ROS mais aussi à la perturbation du métabolisme des lipides, comme cela est observé chez les animaux âgés (Pour une revue : (Schrader and Fahimi, 2004)).

c. Les cytochromes p450

Le système monooxygénase microsomal (MMO) est lié à au feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane externe du noyau. Toutes les enzymes constituant le MMO sont liées par des domaines transmembranaires hydrophobes (via le domaine N-terminal et une boucle protrudente composée des résidus 215 à 232). Ce système catalyse l'oxygénation d'une variété de composés endogènes et exogènes et contient des cytochromes p450 qui peuvent directement réduire O_2 en $O_2^{\cdot -}$ lors du métabolisme de composés xénobiotiques (Goeptar et al., 1995) ; (Pour une revue : (Zangar et al., 2004)).

d. Les NADPH oxydases

La NADPH oxydase des macrophages permet d'éliminer les bactéries séquestrées en produisant des ROS. Une activité NADPH oxydase est également présente dans les tissus non phagocytaires où H_2O_2 est produit en quantité plus faible. L'activité NADPH oxydase est augmentée en fonction des besoins notamment par une série de stimuli d'origine extracellulaire (facteurs de prolifération dont le PDGF, cytokines dont l'angiotensine II et hormones) (Linnane et al., 2007). Les NADPH oxydases non phagocytaires semblent structuralement et fonctionnellement différentes des NADPH oxydases phagocytaires. Il a été démontré que H_2O_2 peut activer ces NADPH oxydases dans les cellules non-phagocytaires pour induire une augmentation de la concentration en ROS (Li et al., 2001).

La NADPH oxydase non phagocytaire est constituée de sous-unités cytoplasmiques ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$) qui, après phosphorylation par des kinases spécifiques, forment des complexes qui sont transférés en membrane plasmique et y interagissent avec les autres sous-unités ($p91^{phox}$, $p22^{phox}$ et Rac2). La sous-unité $p91^{phox}$ (NOX2) est la sous-unité catalytique. Le cycle catalytique est initié par transfert d'électrons de l'oxygène moléculaire à travers un couplage redox avec le NADPH pour produire $O_2^{\cdot -}$. La sous-unité Rac2 est ancrée en membrane plasmique par une chaîne isoprényle et permet la production des ROS par la NADPH oxydase (Li et al., 2001; Sun et al., 2007).

III.2.B. Les ROS d'origine exogène

La production de ROS peut provenir de stress environnementaux comme l'exposition aux ultraviolets (UV), aux radiations ionisantes, à la fumée de tabac, à la pollution, aux xénobiotiques, à l'ozone, ou encore d'infections par des pathogènes, etc. (Ali et al., 1996;

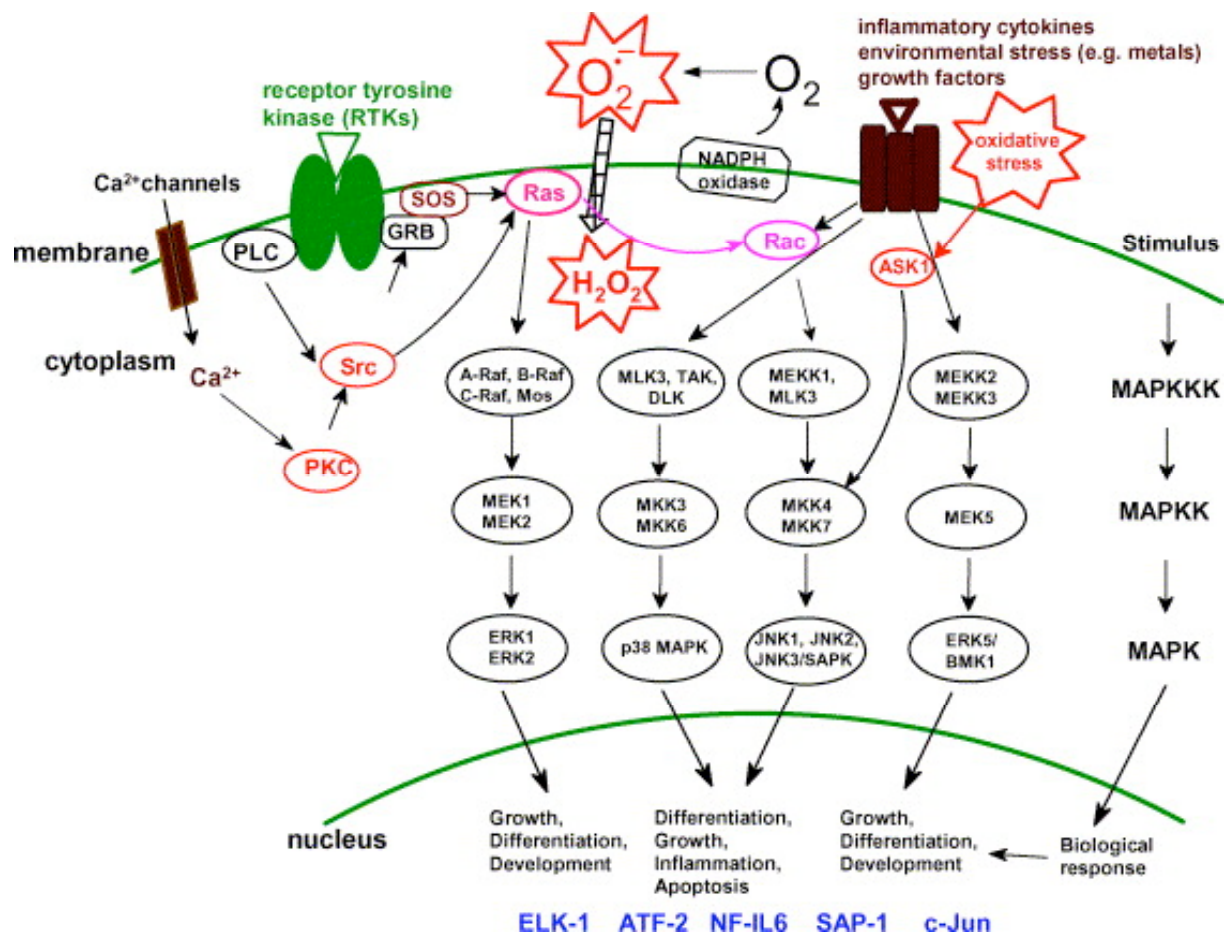


Figure 24 : Voies de signalisation des MAPK induite par les ROS (Valko *et al.*, 2007).

Pagano, 2002; Riley, 1994; Scharffetter-Kochanek et al., 1997; Zhang et al., 2003) ; (Pour une revue : (Shi et al., 2004)).

Les bactéries orales produisent également H_2O_2 , qui, une fois libéré dans la salive, pourrait être utilisé par les peroxydases salivaires afin de générer des substances toxiques bactéricides.

H_2O_2 est également présent dans l'air exhalé par l'être humain sain, et en quantité plus élevée pour les fumeurs.

III.3. Fonction des ROS

Les ROS ne sont pas forcément nocifs. Ils sont reconnus pour jouer un double rôle, en tant qu'espèces nocives ou en tant qu'espèces bénéfiques. En effet, il a été proposé que les ROS en faibles concentrations issus des mitochondries pourraient être importants dans divers processus comme la protection de l'individu face à un pathogène, l'induction de réponses mitogéniques mais aussi dans la transduction du signal dépendant du système redox de la cellule (Pour une revue : (Balaban et al., 2005)). Par exemple, H_2O_2 à des concentrations inférieures à 20-50 μM présente une cytotoxicité limitée et pourrait servir de messager secondaire dans de nombreux types cellulaires (Evans et al., 2000) ; (Pour une revue : (Forman, 2007)). Les ROS peuvent donc être utilisés par la cellule pour induire ou maintenir actives les voies de signalisation impliquées par exemple dans la croissance ou la différenciation (Pour une revue : (Valko et al., 2007)).

La plupart des types cellulaires génèrent de faibles concentrations de ROS après stimulation avec des cytokines, des facteurs de croissance ou des hormones (par exemple, IL-1 β (interleukine-1 β), IL-6, IL-3, TNF- α (« tumor-necrosis factor- α »), angiotensine II, PDGF, NGF, TGF- β 1, FGF (« fibroblast growth factor »)). Les récepteurs aux facteurs de croissance sont des tyrosine kinases qui jouent un rôle dans la transmission de l'information de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. L'information est principalement transmise via les MAPK (mitogen-activated protein kinase) (figure 24). Les différentes MAPK seront décrites plus loin dans l'introduction (page 32).

Des protéines kinases (PTKs) de la famille de Src ou des Janus kinases (JAK) peuvent également être activées par des ROS. Par exemple, le H_2O_2 permet la phosphorylation sur les tyrosines de nombreuses PTKs dans des fibroblastes. Src phosphorylée lie alors la membrane par myristillation et active la voie des MAPK.

Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) sont probablement les cibles directes des ROS les mieux caractérisées. Leur inactivation réversible par les ROS est liée à l'oxydation des résidus cystéine situés au niveau de leur site actif.

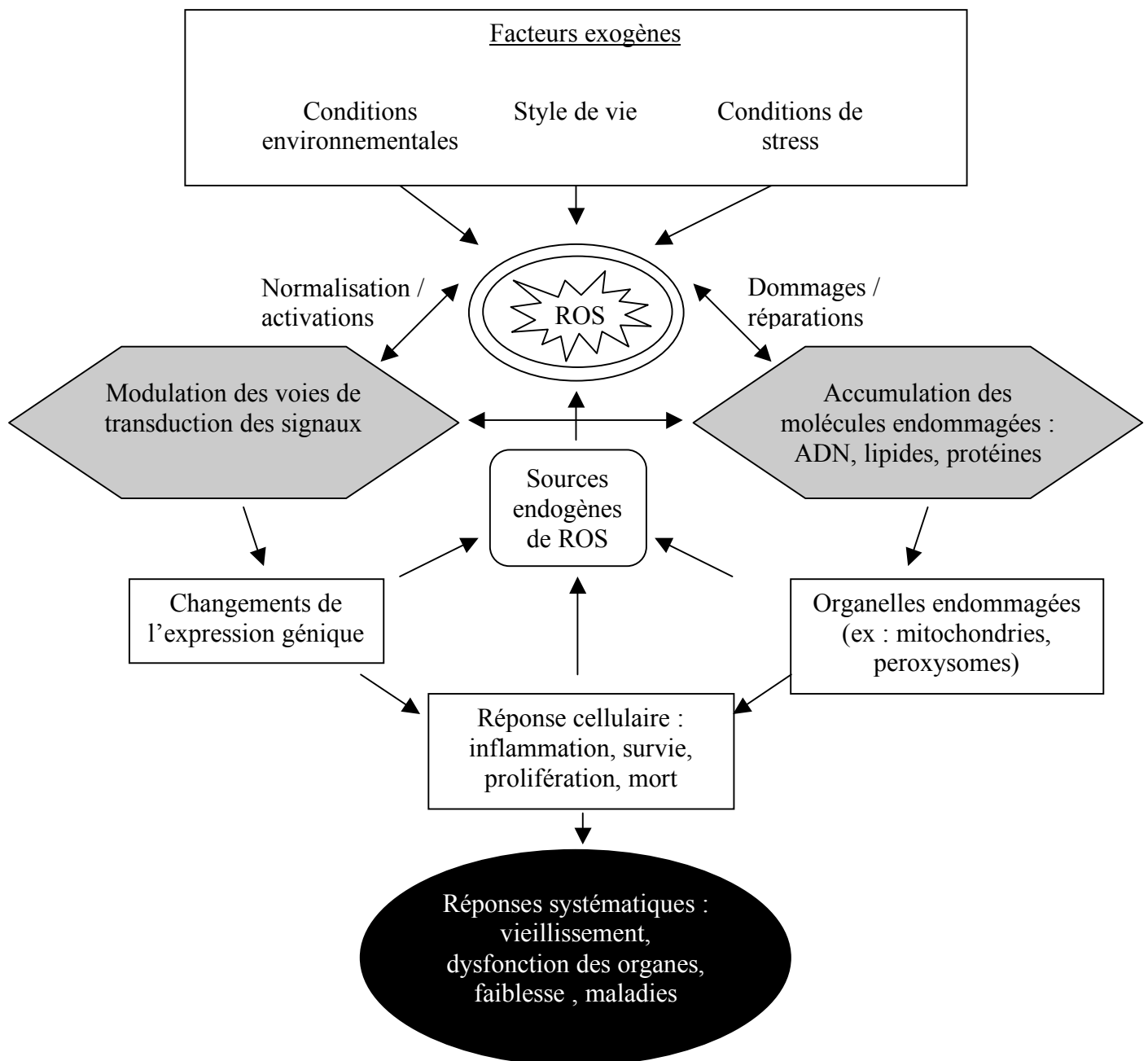


Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes par lesquels les ROS et les stress oxydatifs contribuent au processus du vieillissement. Une variété de facteurs endogènes et exogènes peuvent stimuler la production de ROS au niveau cellulaire. Les ROS stimulent alors les voies de transduction, résultant au changement de l'expression de gènes qui peuvent moduler de nombreuses réponses jouant un rôle important au niveau des fonctions et de la survie cellulaire. De plus, lorsque les processus de réparation sont insuffisants, les ROS peuvent induire des dommages oxydatifs au niveau moléculaire (ADN, protéines, lipides). Cela conduit aux dommages au niveau des organelles, lesquels peuvent directement affecter les réponses cellulaires. Il s'en suit des réponses au niveau cellulaire (inflammation, prolifération, apoptose, nécrose) qui peuvent stimuler la génération de ROS de sources endogènes et à plus long terme le vieillissement, la dysfonction des organes, la fragilité et les maladies liées à l'âge (d'après Kregel *et al.*, 2007).

Il a également été montré que des protéines à activité sérine/thréonine kinase sont impliqués dans la l'induction ou la répression des signaux dépendants des ROS. Par exemple, les PKC (« protéines kinases C ») contiennent des résidus cystéine au niveau de leurs domaines catalytique et régulateur qui peuvent être modifiés par différents oxydants.

La régulation des facteurs de transcription par oxydation est possible par exemple par la formation de ponts disulfure dans les domaines de liaison à l'ADN ou via des phosphorylations/déphosphorylations indirectes. Selon le cas, ces régulations redox peuvent mener à l'activation ou à l'inactivation du facteur de transcription affecté. p53, NFκB ou AP-1 sont des facteurs de transcription impliqués dans le processus du vieillissement et soumis à une régulation redox (Pour une revue : (Kregel and Zhang, 2007)).

De plus, les ROS peuvent réguler positivement ou négativement l'expression de gènes, la différenciation ou l'induction de l'apoptose, par exemple dans le développement du fœtus et le remodelage des tissus. H₂O₂ généré par des phagocytes activés présents sur des sites d'inflammation permet l'augmentation de l'abondance de molécules d'adhérence, la prolifération cellulaire et l'agrégation des plaquettes (Evans et al., 2000).

III.4. Molécules cibles des ROS

Les ROS peuvent cependant oxyder les macromolécules telles que l'ADN, les protéines et les lipides (figure 25).

III.4.A. Oxydation de l'ADN

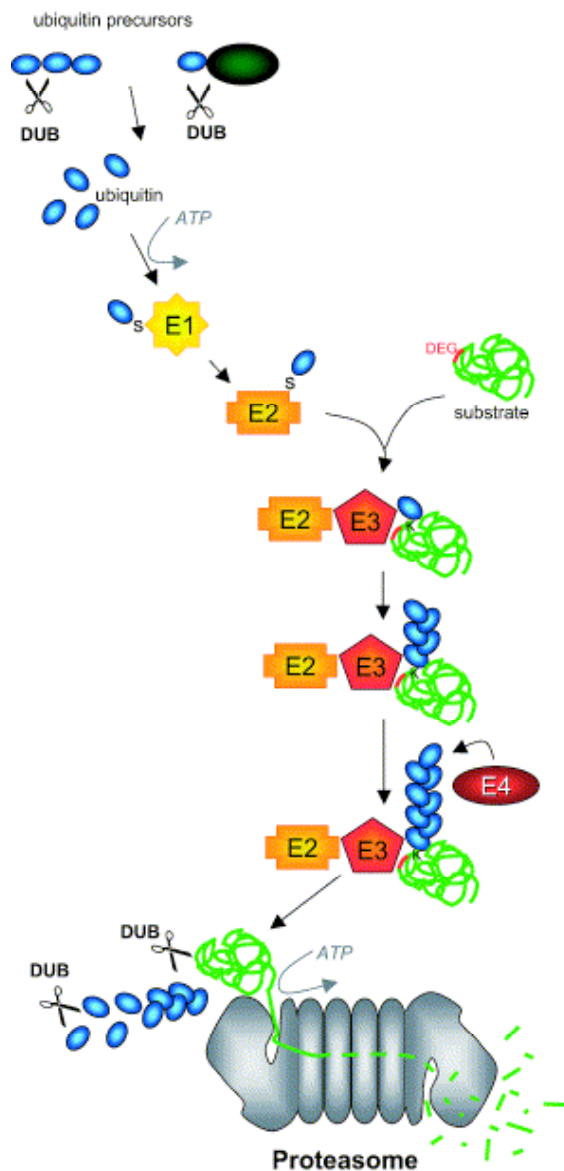
Les bases et les sucres qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. Les ROS induisent des cassures simple ou doubles brin(s) au sein de l'ADN (via l'attaque du déoxyribose) ainsi que de nombreuses modifications chimiques au niveau des bases. Parmi celles-ci, on peut citer la 8-oxoguanine et la 8-oxo-2'-déoxyguanosine. Ces modifications gênent l'appariement correct des bases lors de la réplication de l'ADN. Ces deux modifications de bases sont actuellement considérées comme de bons marqueurs des dommages oxydatifs à l'ADN (Doetsch, 2001). L'accumulation des dommages en fonction de l'âge varie en fonction des tissus et pourrait contribuer à la variation de l'expression de gènes observée chez les individus âgés (Pour une revue : (Finkel et al., 2007)).

L'instabilité et les mutations au sein de l'ADN sont également des marqueurs de cancers. Il n'est donc pas surprenant d'observer une altération des facteurs impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN chez les patients atteints d'un cancer (Pour une revue : (Finkel et al., 2007)).


Acide aminé	Produits d'oxydation
Cystéine	Pont disulfure, acide sulfénique, acide sulfinique, acide sulfonique
Méthionine	Méthionine sulfoxyde, méthionine sulfone
Tryptophane	Hydroxytryptophane, kynurénine, hydroxy- et formyl-kynurénine
Phénylalanine	Hydroxyphénylalanine, dihydroxyphénylalanine
Tyrosine	Dihydroxyphénylalanine, ponts tyrosine-tyrosine, nitrotyrosine
Histidine	Oxohistidine, asparagine, acide aspartique
Arginine	Semialdéhyde glutamique
Lysine	Semialdéhyde α -aminoadipique
Proline	Semialdéhyde glutamique, hydroxyproline, pyrrolidone
Thréonine	Acide 2-amino 3-cetobutyrique
Acide glutamique	Acide oxalique, acide pyruvique


Figure 26 : Liste des acides aminés les plus sensibles à l'oxydation et des produits dérivés suite à une oxydation. La formation d'oxo-acides et d'aldéhydes comme produits d'oxydation de certains acides aminés conduit à l'apparition de groupements carbonyles sur les protéines oxydées (Friguet, 2003).


Ubiquitin/proteasome system



Components/substrates involved in conformational disorders

 Aberrant ubiquitin:
• UBB¹ in AD, MB

 DUB:
• UCH-L1 in PD

 Substrate:
• Expanded polyQ repeats in HD, SCAs
• α -synuclein in PD
• CFTR in CF
• Rhodopsin in RP
• UBB¹ in AD, MB


 E3:
• Parkin in PD (AR-JP)
• UCH-L1 in PD

Figure 27 : Schéma reprenant le processus menant à la dégradation d'une protéine par le protéasome. La protéine destinée à être dégradée est reconnue par la machinerie d'ubiquitylation, ce qui conduit à la formation d'une chaîne d'ubiquitines liées par des liens covalents. La formation de cette chaîne est accompagnée par une série d'événements enzymatiques réalisés successivement par les protéines E1 (« ubiquitin-activating enzyme »), E2 (« ubiquitin-conjugating enzyme ») et E3 (« ubiquitin ligase »). L'enzyme E4 (« ubiquitin elongation factor ») est nécessaire à la polyubiquitylation pour la dégradation de certains substrats. L'enzyme E3 reconnaît les signaux de dégradation comme les motifs mal repliés, non repliés ou anormaux de la protéine. Le complexe macromoléculaire du protéasome reconnaît ensuite cette protéine ubiquitylée. Cette chaîne est libérée et désassemblée par des enzymes de déubiquitylation spécifiques. La protéine est ensuite clivée en de petits fragments par le protéasome (Lindsten *et al.*, 2003).

III.4.B. Oxydation des protéines

a. Modifications et agrégation des protéines

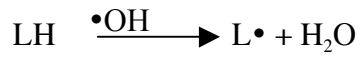
L'oxydation des acides aminés conduit à l'inactivation des protéines et requiert leur protéolyse afin d'empêcher leur accumulation. Les acides aminés les plus sensibles sont les résidus cystéine et méthionine (Figure 26). De plus, les protéines oxydées sont généralement moins thermostables que leur forme native. Les protéines oxydées peuvent perdre leur activité (Pour une revue : (Fridovich, 2001)). Les ponts disulfures représentent un exemple de produit de l'oxydation des résidus cystéine. La méthionine est tout d'abord transformée en méthionine sulfoxyde pour être ensuite oxydée en méthionine sulfone. Ces transformations de la méthionine sont accompagnées par des changements des propriétés physico-chimiques puisque l'hydrophobicité et la flexibilité de la méthionine diminuent. (Pour une revue : (Mary et al., 2004) ; (Friguet, 2003)).

Il a été proposé que l'accumulation de protéines oxydées avec l'âge résulte d'une altération de l'homéostasie et de la protéolyse. Par exemple, les changements dans la structure du protéasome observés avec l'âge conduisent à une accumulation de protéines modifiées par oxydation en raison de leur protéolyse altérée (Grune et al., 2004).

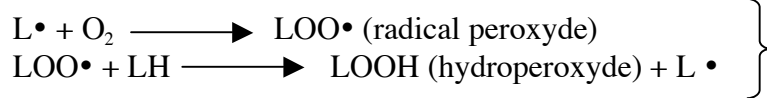
Les protéines oxydées qui deviennent plus hydrophobes peuvent s'associer aux lipides pour former des agrégats appelés « lipofuscine » ou pigments d'âge (Pour une revue : (Halliwell, 2001)). Certains neurones de personnes centenaires peuvent contenir 75 % de lipofuscine (Sitte et al., 2000). La maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington sont appelées maladies conformationnelles et sont caractérisées par une accumulation de protéines mal repliées ou en agrégats (Pour une revue : (Grune et al., 2004)).

b. Le protéasome

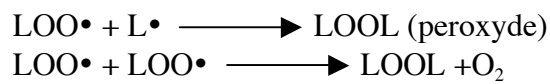
La fonction principale du complexe du protéasome est de reconnaître et de dégrader les protéines dans le cytosol et le noyau (figure 27) (Pour une revue : (Lindsten and Dantuma, 2003)). Ce système a été conservé durant l'évolution, de la levure aux mammifères. Le protéasome ne dégrade pas uniquement les protéines mal repliées ou endommagées mais également des protéines nouvellement synthétisées devant être régulées après leur translocation dans le cytosol. En effet, de nombreuses études tendent à montrer que ces protéolyses font partie du système d'induction ou de répression de la transduction de certains signaux cellulaires.



Initiation



**Propagation
n fois**



Terminaison

Figure 28 : Chaîne de peroxydation lipidique membranaire. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne caractérisée par trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (d'après Davies, 2000).

Il n'est pas encore clairement compris comment le système d'ubiquitinylation reconnaît les protéines abérantes, mais de récentes études proposent une voie reliant les protéines chaperonnes et le système d'ubiquitinylation (Pour une revue : (Lindsten and Dantuma, 2003)).

L'altération des fonctions du protéasome est observée avec l'âge dans différents types cellulaires et tissus. Une étude basée sur les 2DGE a démontré que la proportion des différentes sous-unités du protéasome ainsi que leurs modifications post-traductionnelles peuvent être altérées. Par exemple, le nombre de modifications du protéasome par la glycoxydation augmente avec l'âge des hommes. L'activité du protéasome peut donc également être altérée par les ROS. Avec l'âge de l'individu, l'accumulation de protéines inhibitrices comme la lipofuscine peuvent également être responsable de l'inhibition des activités du protéasome (Pour une revue : (Friguet, 2006)).

Lorsque la protéolyse dépendante du système du protéasome est compromise, deux conséquences sont observées. Premièrement, l'élimination inefficace de protéines mal repliées entraîne leur accumulation. Deuxièmement, la redistribution des composants du système protéasome-ubiquitine qui accompagne la formation d'agrégats peut résulter en un affaiblissement général du système. Ces deux conséquences sont bien entendu liées entre elles (Pour une revue : (Lindsten and Dantuma, 2003)).

La mitochondrie est la majeure source de ROS intracellulaires mais est également endommagée par les ROS. Dans la mitochondrie, la dégradation des protéines oxydées est réalisée par la protéase Lon dépendante de l'ATP. La sous-expression de la protéase Lon entraîne une augmentation de la quantité de protéines oxydées ainsi qu'une altération de la structure et de la fonction des mitochondries, entraînant la mort cellulaire par apoptose (Pour une revue : (Friguet, 2006)).

III.4.C. Oxydation des lipides

Les membranes cellulaires sont composées de phospholipides (PL), de cholestérol, de protéines et d'hydrates de carbone. Différentes classes de PL constituent les membranes. Les membranes jouent notamment un rôle important dans le maintien des fonctions cellulaires puisqu'elles jouent le rôle de barrière afin de contrôler les échanges entre la cellule et son environnement (Pour une revue : (Evans and Halliwell, 2001)) ; (Yu, 2005).

Les lipides membranaires et plus précisément leurs acides gras polyinsaturés sont des cibles privilégiées des ROS (figure 28) (Davies, 2000). La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui est initiée par l'attaque d'un acide gras insaturé (LH) par un radical R^\bullet tel que $\bullet OH$. Dans un environnement aérobie, l'oxygène se lie au radical lipidique pour donner le radical peroxyde (LOO^\bullet). Celui-ci peut propager la réaction en chaîne de peroxydation par abstraction

d'un atome d'hydrogène d'un autre acide gras insaturé. L'hydroperoxyde (LOOH) peut être décomposé en d'autres espèces réactives : des radicaux alkoxyles (LO^\bullet), des aldéhydes tel que la malonyldialdéhyde, des alcanes, des alcools, etc. (Pour une revue : (Halliwell and Chirico, 1993)).

Au cours du vieillissement des changements de profils des PL ont lieu dans les membranes biologiques, comme la réduction du nombre total de PL, des modifications de la composition des différentes sous-classes de PL et des changements dans leur distribution asymétrique dans la bicouche lipidique. Cela engendre une détérioration et une instabilité de l'intégrité membranaire conduisant à un déclin des fonctions associées aux membranes et à la libération des lipides au sein des cellules et des tissus. Les lipides oxydés peuvent alors agir comme agent de pontage et jouer un rôle dans l'agrégation des protéines (Pour une revue : (Evans and Halliwell, 2001)) ; (Yu, 2005).

III.5. Mécanismes de défense contre les ROS

La production de ROS peut avoir des effets délétères extrêmes. Heureusement, les cellules d'organisme en bonne santé sont capables de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par les ROS et possèdent un système antioxydant.

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente en faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Pour une revue : (Beckman and Ames, 1998a; Beckman and Ames, 1998b)). Ces systèmes de défense peuvent soit empêcher la formation de ROS (antioxydants primaires), soit épurer le milieu environnant contenant des ROS (antioxydants secondaires).

Les antioxydants comprennent des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques mais aussi de petites molécules hydro- ou lipo-solubles.

III.5.A. Les enzymes antioxydantes

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes qui convertissent $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (figure 23). Trois isoformes de ces métallo-protéines existent. La Mn-SOD mitochondriale (ou SOD2) la Cu/Zn-SOD cytosolique (ou SOD1) et la EC-SOD de la matrice-extracellulaire (ou SOD3). H_2O_2 est ensuite métabolisé par la catalase, ou la glutathion peroxydase dépendante du selenium (GPX1). La GPX1 est une protéine contenant de la sélénocystéine et dépendant du glutathion. Le glutathion oxydé est non toxique et peut être réduit par le NADPH grâce à la glutathion réductase (GSHR). Les glutathion transférases (GST) cytosoliques, mitochondriales

Enzyme	Substrat	Localisation subcellulaire
Catalase	H ₂ O ₂	Peroxisomes, cytosol, noyau
Glutathion peroxydase	H ₂ O ₂	Tous les compartiments cellulaires
Mn SOD	O ₂ ^{•-}	Peroxisomes, mitochondrie
Cu, Zn SOD	O ₂ ^{•-}	Peroxisomes, cytosol
Epoxyde hydrolase	Epoxides	Peroxisomes, cytosol, RE
Peroxi-redoxine	H ₂ O ₂	Peroxisomes, cytosol, noyau

Figure 29: Enzymes antioxydantes et leurs localisations subcellulaires.

ou membranaires permettent de détoxifier des composés tels que des agents carcinogènes, des drogues thérapeutiques, des toxines environnementales ou les produits des stress oxydatifs par conjugaison avec du glutathion réduit (Hayes et al., 2005). Les peroxyredoxines (PRDX), qui possèdent une activité peroxydase dépendante de la thioredoxine et l'époxyde hydrolase du peroxysome jouent également un rôle important dans la protection cellulaire contre les stress oxydatifs (Pour une revue : (Evans and Halliwell, 2001)) ; (Pour une revue : (Schrader and Fahimi, 2004)). La catalase, la GPX1, la SOD, et les peroxyredoxine se trouvent généralement dans les peroxysomes mais n'y sont pas confinées (figure 29). Rappelons que la G6PD est la première enzyme de la voie des pentoses phosphates (Ho et al., 2007). La réaction qu'elle catalyse est couplée à la réduction d'une molécule de NADP⁺ en NADPH et constitue l'une des sources importantes de ce donneur d'électrons qui joue un rôle clé dans la défense contre les stress oxydatifs.

III.5.B. Les molécules antioxydantes non-enzymatiques

Très brièvement, la vitamine E (α -tocophérol), la coenzyme Q (ubiquinone) et les caroténoïdes protègent contre la peroxydation lipidique. La vitamine C réagit avec certains ROS directement et recycle probablement la vitamine E. Leur effet protecteur est lié à leur capacité à céder un de leurs électrons pour arrêter la propagation radicalaire tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation, soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant (Bors et al., 1990).

Après avoir décrit le modèle de Hayflick et de la sénescence répllicative, nous nous sommes tournés très succinctement vers les stress oxydatifs. Nous allons à présent présenter la sénescence induite prématurément par les stress.

IV. SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR LES STRESS

IV.1. Introduction

De nombreuses études expérimentales *in vitro* ont montré que des stress oxydatifs chroniques ou aigus sublétaux permettent d'induire la sénescence prématurée de différents types cellulaires (Pour une revue : (Toussaint et al., 2000)).

IV.2. Stress chroniques et aigus sublétaux

IV.2.A. Stress chroniques sublétaux

Dans des travaux devenus classiques, l'équipe de T. Von Zglinicki a démontré que des FDHs WI-38 soumis à une hyperoxie chronique sublétale (40% O₂) présentent un phénotype sénescence après seulement environ 4 doublements de population en culture (von Zglinicki et al., 1995). Les cassures simple et doubles brin(s) de l'ADN qui apparaissent lors des dommages causés par l'hyperoxie chronique s'accumulent préférentiellement au niveau des télomères et sont responsables d'un raccourcissement accéléré (500 pb par doublement de population au lieu de 90 pb pour les cellules de la même souche en normoxie) lorsque les cellules continuent de se diviser dans ces conditions de stress oxydatif (Petersen et al., 1998) ; (Pour une revue : (von Zglinicki, 2000)). Ce raccourcissement télomérique critique d'environ 2 Kb est reconnu par la cellule comme dommage à l'ADN, ce qui permet un arrêt du cycle cellulaire suite à l'activation de p53 (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Saretzki et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc l'implication d'un raccourcissement télomérique critique dans l'apparition de la sénescence prématurée induite par un stress sublétal chronique. L'étude des effets d'exposition prolongée à l'hyperoxie a également été réalisée avec des cellules endothéliales et des mélanocytes (Pour une revue : (Toussaint et al., 2000)) ; (Honda et al., 2002).

IV.2.B. Stress aigus sublétaux

a. Généralités

Des FDHs jeunes traités avec des concentrations sublétales de molécules comme H₂O₂, le *t*-BHP, l'éthanol, ou exposés à des doses sublétales d'UVB entrent en sénescence prématurée (Chainiaux et al., 2002; Chen and Ames, 1994; Chen et al., 1998; Chen et al., 2000b; Dumont et al., 2000b; Fripiat et al., 2000; Rodemann et al., 1989; Saretzki et al., 1998; Toussaint et al.,

Spot #	Identification	DB #	MW	pI	Ratio RS	Ratio t-BHP	Ratio EtOH
N 101	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.4 ± 0.2
I 818	Peroxioredoxin VI	P30041	25	6.3	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.4
I 709	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		new spot	new spot
I 1086	14-3-3 protein tau	P27348	28	4.7		new spot	new spot
I 667	actin isoform (between 30 and 35 kDa)	P53493	42	5.3		1.7 ± 0.5	2.5 ± 0.6
I 717	Peroxioredoxin VI	P30041	25	6.3			1.5 ± 0.3
N 102	pyruvate kinase M	P14618	58	7.6			1.5 ± 0.2
I 610	esterase D	P10768	31	7.0			1.4 ± 0.3
I 689	guanidinoacetate N methyltransferase	Q14353	26	5.7			1.3 ± 0.1
I 1025	HSP90	P08238	83	4.8			0.6 ± 0.3
I 913	HSP90	P08238	83	4.8			0.7 ± 0.2
I 46	glucosidase II precursor	Q14679	107	6.0		1.7 ± 0.3	

Figure 30 : Liste des protéines différentiellement néosynthétisées et identifiées au cours d'une étude basée sur l'utilisation des 2DGE et visant à comparer des FDHs WI-38 jeunes, en sénescence répllicative ou en sénescence prématurée induite par des stress répétés avec du *t*-BHP (*tert*-butylhydroperoxyde) ou de l'éthanol (Dierick *et al.*, 2002b).

Abbreviations	GenBank	Name	Function	ADD RT-PCR	Δ Array	Δ Real-time RT-PCR
<i>t</i>-BHP induced SIPS						
APOJ	NM_001831	ApolipoproteinJ	Stress Response		1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
CAV1	NM_001753	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	Transport		1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.1
FN1	NM_002026	Fibronectin	Extracellular matrix		1.7 ± 0.0	
FTL	NM_000146	Ferritin, light polypeptide	Cell homeostasis	UP	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1
IGFBP3	NM_000598	Insulin-like growth factor binding protein3	Cytokines and growth factors		2.4 ± 0.3	1.9 ± 0.2
LOXL2	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	Extracellular matrix	UP	1.6 ± 0.2	2.5 ± 0.4
OSTEO	NM_003118	Osteonectin	Extracellular matrix		1.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1
TFR	NM_003234	Transferrin receptor	Receptor		2.1 ± 0.3	3.1 ± 0.7
TGF β 1	NM_000660	TGF-beta1	Cytokines and growth factors		1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1
ADAT1	NM_012091	Adenosine deaminase, t-RNA specific 1	RNA processing		-1.8 ± 0.2	
HARC	NM_017913	HSP90-associating relative of Cdc37	Chaperone	DOWN	-1.7 ± 0.1	
<i>EtOH induced SIPS</i>						
APOJ	NM_001831	ApolipoproteinJ	Stress Response		1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.3
CAV1	NM_001753	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	Transport		1.8 ± 0.1	2.4 ± 0.2
FN1	NM_002026	Fibronectin	Extracellular matrix		1.9 ± 0.2	
FTL	NM_000146	Ferritin, light polypeptide	Cell homeostasis	UP	1.6 ± 0.0	1.6 ± 0.1
IGFBP3	NM_000598	Insulin-like growth factor binding proteins	Cytokines and growth factors		2.2 ± 0.2	2.6 ± 0.4
LOXL2	NM_002318	Lysyl oxidase-like 2	Extracellular matrix	UP	1.7 ± 0.3	2.6 ± 0.6
OSTEO	NM_003118	Osteonectin	Extracellular matrix		2.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2
S100A4	NM_002961	S100 calcium binding protein A4	Calcium binding		1.7 ± 0.2	
TFR	NM_003234	Transferrin receptor	Receptor		1.8 ± 0.2	5.2 ± 0.9
TGF β 1	NM_000660	TGF-beta1	Cytokines and growth factors		1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
ADAT1	NM_012091	Adenosine deaminase, t-RNA specific 1	RNA processing		-2.5 ± 0.2	
HARC	NM_017913	HSP90-associating relative of Cdc37	Chaperone	DOWN	-1.8 ± 0.2	

Figure 31 : Liste des transcrits identifiés au cours d'une étude basée sur l'utilisation du « differential display RT-PCR », des micro-damiers à ADN et de la RT-PCR en temps réel et visant à comparer des FDHs WI-38 jeunes et en sénescence prématurée induite par des stress répétés avec du *t*-BHP ou de l'éthanol. En gras : marqueurs de la sénescence (Pascal *et al.*, 2005).

<div>SIPS</div> <div>Gène</div>	Nom	UVB	PUVA	PUVA	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	<i>t</i> -BHP	EtOH
		AG04431	AG04431	FF95	BJ	BJ-htert	IMR90-htert	WI-38	WI-38
<u>Apoptose</u>									
BAX	BCL2-associated X protein		↑ 1.5		↑ 2.4	↑ 1.6			
<u>Cycle cellulaire</u>									
CCND1	Cyclin D1	↑ 2.1	↑ 2.8	↑ 2.1					
ODC	Ornithine decarboxylase 1	↑ 2.3	↑ 1.8	↑ 3.2	↑ 1.6	↓ 1.8			
p21 ^{WAF-1}	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	↑ 1.9	↑ 3.6	↑ 4.3	↑ 2.1		↑ 2.1	↑ 1.5	↑ 1.6
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	↑ 2.1	↑ 4.4	↑ 2.2		↑ 1.6			
<u>Facteur de croissance / cytokines</u>									
CTGF	Connective tissue growth factor	↑ 2.1	↓ 2.3	↑ 1.8	↑ 2.7		↑ 1.6		
<u>Inflammation</u>									
IL1-β	Interleukin 1, beta	↑ 2.4		↑ 1.8	↑↑				
IL11	Interleukin 11	↑ 1.8					↑ 1.6	↑ 1.6	↑ 1.9
<u>Matrice extracellulaire / Structure</u>									
FN1	Fibronectin 1	↑ 1.9	↓ 1.7	↑ 2.0				↑ 1.7	↑ 2.1
MMP3	Matrix metallopeptidase 3		↑ 1.7		↑ 4.5	↑↑			
Osteo	Osteonectin	↑ 2.4	↓ 1.6					↑ 1.7	↑ 1.9
TPA	Plasminogen activator tissue	↑ 2.1	↑ 2.2				↑ 1.5		
<u>Métabolisme</u>									
CANX	Calnexin	↑ 1.8	↑ 1.7		↑ 1.6				
<u>Réponse au stress</u>									
ANX1	Annexin A1	↑ 1.8	↑ 1.6	↑ 2.7					
AOP2	Peroxiredoxin 6	↑ 1.7	↑ 1.6	↑ 1.6	↓ 2.3		↑ 1.6		
APOJ	Apolipoprotein J	↑ 2.0		↓ 2.3				↑ 1.9	↑ 2.6
GPX	Glutathione peroxidase 1	↑ 1.6	↑ 2.0	↑ 1.8			↑ 1.5		
HMOX	Heme oxygenase 1	↑ 2.4	↑ 1.6	↑ 2.6		↓↓		↑ 1.8	↑ 2.1
HSP90-α	Heat shock protein 90kDa alpha	↑ 2.3	↑ 3.3	↑ 2.1					
<u>Synthèse / Réparation / Structure ADN</u>									
GADD153	DNA damage inducible transcript 3			↑ 2.4	↓ 1.6	↓ 4.7		↑ 2.1	↑ 1.9
HB2/S	Histone 1, H2bk	↑ 1.6	↑ 4.2				↑ 2.7	↑ 1.6	↑ 1.7
<u>Transduction du signal</u>									
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	↑ 2.7	↓ 2.2				↑ 2.0	↑ 2.6	↑ 3.5
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5	↑ 1.8	↓ 1.2		↑ 1.6	↑ 2.1	↑ 2.6	↑ 2.1	↑ 2.4
JNK2	Mitogen activated protein kinase 9	↑ 1.8						↑ 2.2	↑ 2.7

Figure 32 : Récapitulatif des gènes qui sont différentiellement exprimés au niveau du transcrit et qui présentent des augmentations comparables dans le même sens dans au moins 3 modèles parmi les dermes équivalents exposés aux UVB, les FDHs de peau en SIPS sous UVB (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005), sous PUVA (Psoralène +UVA) (Borlon *et al.*, 2007), ou H₂O₂ (de Magalhaes *et al.*, 2004), et les FDHs de poumons en SIPS sous H₂O₂ (Zdanov *et al.*, 2006) *t*-BHP ou éthanol (Pascal, 2006) comparés aux contrôles après 72 h de récupération (↑: abondance de transcrits augmentée, ↓: abondance de transcrits diminuée, l'absence de chiffre rend compte d'un résultat qualitatif non quantifiable suite à l'absence de transcrits dans l'une des conditions). Les gènes présentés en gras sont différentiellement exprimés dans le même sens dans au moins 4 modèles ou plus parmi les modèles mentionnés ci-dessus.

1992; Toussaint et al., 1995; von Zglinicki et al., 1995; Zdanov et al., 2006). Des marqueurs communs avec ceux de la sénescence répllicative sont observés 2 à 3 jours après les stress. Parmi ceux-ci, on peut citer un arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase G1/S, la surexpression de p21^{WAF-1}, l'apparition de l'activité SA β -gal, la délétion commune dans l'ADN mitochondrial ou encore le changement d'abondance de nombreux transcrits dits « associés à la sénescence ». De plus, une morphologie étalée et irrégulière des FDHs sénescents se développe selon un programme impliquant une hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), l'augmentation des fibres de stress d'actine, la redistribution des protéines d'adhérence focale (paxilline et vinculine) et la synthèse protéique *de novo* (Chen et al., 2000c).

Au laboratoire, une étude protéomique et plusieurs études transcriptomiques ont été réalisées afin d'identifier des marqueurs moléculaires impliqués dans l'apparition du phénotype de sénescence prématurée induite par un ou des stress sublétaux.

Chez les FDHs WI-38 en sénescence prématurée induite par des stress répétés avec du *t*-BHP ou de l'éthanol, 12 protéines sont plus néosynthétisées que dans les FDHs jeunes (figure 30) (Dierick et al., 2002b). Seulement 5 de ces protéines sont communes aux deux types de stress. Une étude transcriptomique réalisée sur le même type cellulaire a montré une corrélation entre les variations d'abondance de transcrits observées par « differential display RT-PCR » et par micro-damiers à ADN ou par RT-PCR en temps réel (figure 31) (Pascal et al., 2005). Ces études permettent de penser que, bien que la sénescence répllicative et la sénescence prématurée induite par un (ou des) stress présentent des caractéristiques communes, ces deux phénotypes ne sont pas similaires.

Parmi les différentes études transcriptomiques réalisées au laboratoire sur la sénescence prématurée induite par différents types de stress, 24 transcrits présentent des variations communes pour au moins 3 de ces différentes études (Par exemple, p21^{WAF-1}, IL-11, fibronectine, MMP3 (métalloprotéinase 3), peroxyredoxine 6, IGFBP3 et IGFBP5 (« insulin-like growth factor-binding protein 3/5 ») (figure 32).

D'autres types cellulaires peuvent présenter le phénotype de sénescence prématurée comme des cellules endothéliales ou des mélanocytes (Chen and Ames, 1994; Fenton et al., 2001; Medrano et al., 1995). Ce modèle de SIPS (« stress induced premature senescence ») a pu également être utilisé pour tester les effets délétères à long terme d'un stress unique, de stress répétés, de molécules à des concentrations sublétales mais aussi pour tester l'effet protecteur d'autres molécules contre ces effets délétères (Pour revue : (Toussaint et al., 2000)).

Ainsi, bien que la sénescence répllicative ait été le modèle utilisé pour l'étude du vieillissement, de nombreux débats ont eu lieu quant à savoir si cette sénescence répllicative a lieu *in vivo* durant

le processus de vieillissement. Etant donné que les oxydants jouent un rôle dans ce phénomène, il a été proposé que le modèle de sénescence prématurée induite par un stress oxydatif pourrait être plus représentatif et donnerait un avantage dans l'étude de l'expression des gènes et de leur régulation qui contrôle le processus de vieillissement ou des maladies associées (Chen et al., 2001; Dumont et al., 2001) (Pour une revue : (Toussaint et al., 2002)).

b. Traitement avec H_2O_2 de FDHs de poumons foetal de souche IMR-90

Plusieurs études qui utilisent des FDHs exposés à une concentration sublétale de H_2O_2 en tant que modèle de sénescence prématurée ont déjà été publiées (Chen and Ames, 1994; Chen et al., 1998; Chen et al., 2000c; Chen et al., 2000d; Frippiat et al., 2000; Frippiat et al., 2001; Frippiat et al., 2002). En effet, H_2O_2 est largement utilisé pour induire la sénescence prématurée en un temps relativement court (Chen et al., 2007).

Des FDHs normaux IMR-90 traités avec une concentration sublétale de H_2O_2 présentent une augmentation transitoire de l'abondance de p53, une abondance élevée de p21^{WAF-1}, une diminution de phosphorylation de Rb et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Chen et al., 1998; Frippiat et al., 2000). Il a également été démontré que les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 à différentes concentrations sublétales présentent des cassures de l'ADN immédiatement après le traitement, une augmentation d'abondance de p53 acétylée à 4 h, et que l'arrêt du cycle cellulaire a déjà lieu 24 h après le traitement (Furukawa et al., 2007). Dans ces cellules, la présence de l'activité SA β -gal est un marqueur spécifique de la sénescence prématurée et est corrélée à l'incapacité de ces cellules à synthétiser de l'ADN (Chen et al., 2000d). Des FDHs IMR-90 en apoptose présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase S, une abondance beaucoup plus élevée de p53 mais pas d'induction de p21^{WAF-1} (Chen et al., 2000b). Contrairement aux FDHs placés sous hyperoxie, les FDHs IMR-90 stressés deux fois avec 75 μ M de H_2O_2 deviennent prématurément sénescents sans montrer cependant de raccourcissement télomérique juste après les stress (Chen et al., 2001). Ceci n'est pas étonnant puisque, dans ces conditions, les cellules cessent de se diviser pendant le stress et entre les stress, contrairement aux cellules soumises à des stress chroniques modérés (ex : 40% O_2). Si on expose des FDHs WI-38 à un seul stress avec H_2O_2 à concentration sublétale, environ 15 % des cellules récupèrent leur potentiel prolifératif à 10-12 jours après ce stress. Ceci entraîne un raccourcissement télomérique de 300 pb à 18 jours après ce stress (Dumont et al., 2001). Or, en condition de culture habituelle, les télomères des FDHs WI-38 raccourcissent d'environ 100 paires de bases par doublement de population. Donc, un raccourcissement de 300 paires de bases correspondrait à 3 doublements de population, ce qui s'explique lorsque 15 % des cellules d'une population cellulaire se divisent en moyenne 3 fois

avant de devenir confluentes. On sait par ailleurs qu'il faut jusqu'à 18 jours pour réparer les cassures simple brin au niveau de l'ADN générés par H_2O_2 à une concentration sublétales (Petersen et al., 1998). Une partie très limitée de ce raccourcissement a pu être expliquée par des dommages à l'ADN (von Zglinicki, 2002) ; le reste étant attribué au processus normal de duplication de l'ADN. Le raccourcissement télomérique limité semblerait plutôt être la conséquence et non la cause de la sénescence prématurée. De plus, il reste possible d'induire la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 surexprimant la sous-unité catalytique de la télomérase et conservant de longs télomères (de Magalhaes et al., 2002; Lindvall et al., 2003; Zdanov et al., 2006).

IV.3. Sénescence induite prématurément par H_2O_2 et transduction du signal

Dans ce chapitre, nous nous pencherons tout d'abord sur les acteurs impliqués dans les voies de signalisation qui sont générées lors de la sénescence prématurée, après quoi nous présenterons plus en détails le rôle que jouent ces acteurs lors de la sénescence prématurée.

IV.3.A. Le TGF- β 1

a. Description

Le « Transforming-Growth Factor- β 1 » (TGF- β 1) est un membre d'une famille de plus de 60 cytokines présentes chez les vertébrés et qui reprend notamment le TGF- β 2, le TGF- β 3, les activines, les BMPs (« Bone Morphogenetic Proteins ») (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)). Ces protéines jouent un rôle important dans le développement et l'homéostasie des tissus (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)). Les trois isoformes du TGF- β sont codées par trois gènes différents, possèdent un motif semblable et présentent une identité de 75 % (Pour une revue : (Schiller et al., 2004b)). Même si les trois isoformes présentent des propriétés similaires *in vitro*, elles ont des effets distincts *in vivo* (Annes et al., 2003). La perturbation de la signalisation activée par le TGF- β 1 est impliquée dans des maladies comme le cancer, la fibrose et les maladies auto-immunes (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)). Par exemple, le TGF- β 1 est impliqué dans l'induction de fibroses pulmonaires en réponse à des dommages puisqu'il permet le processus de différenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses comme des fibroblastes ou des myofibroblastes (Pour une revue : (Willis and Borok, 2007)). Le TGF- β 1 fut initialement découvert comme étant un facteur favorisant la transformation cellulaire (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)).

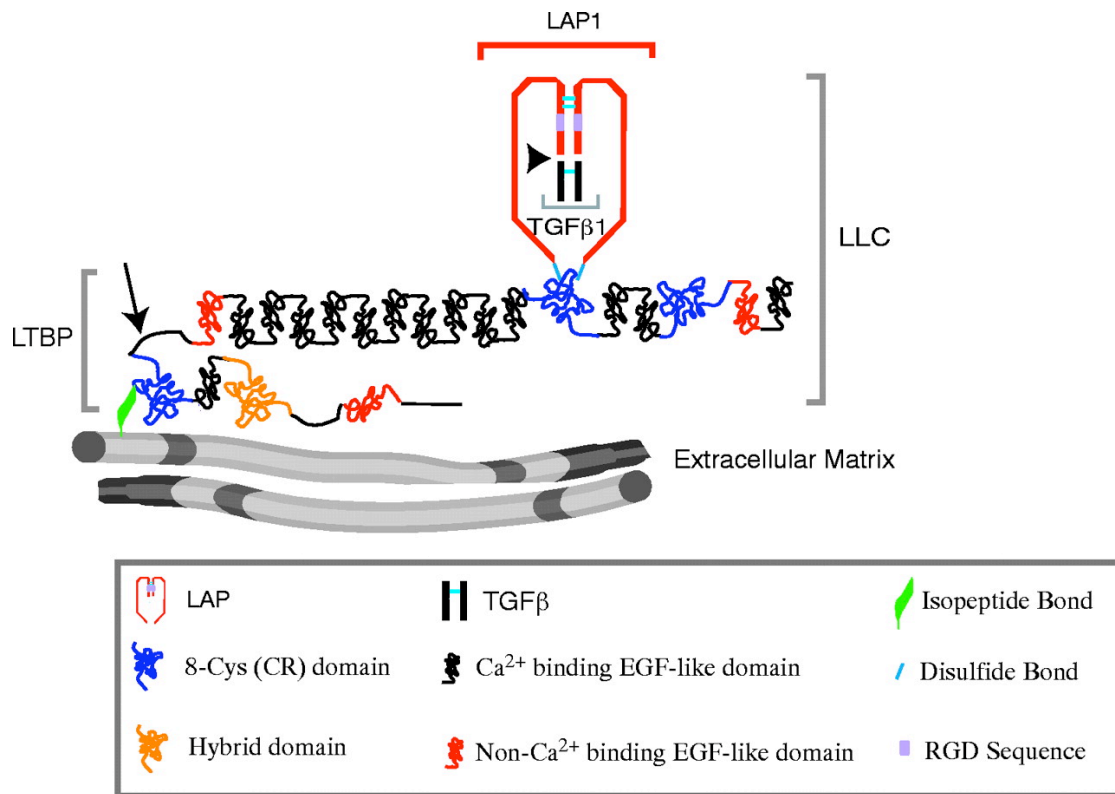


Figure 33 : Le « latent large complex» (LLC) du TGF-β1. Le LLC comprend le TGF-β1 (en noir), le LAP (en rouge) et le LTBP. Le TGF-β1 et le LAP sont séparés par protéolyse au niveau du site indiqué par une tête de flèche. Le TGF-β1 reste ensuite lié de façon non-covalente au LAP. Le LAP et LTBP sont associés par des ponts disulfure (en bleu clair). Le LLC est lié de façon covalente à la matrice extracellulaire à travers un pont isopeptide (en vert) entre le côté N-terminal de LTBP et les protéines de la matrice. Le domaine charnière de LTBP, indiqué par une flèche, est une région sensible à la protéolyse qui permet au LLC d'être libéré de la matrice extracellulaire (Annes *et al.*, 2003).

b. Régulation du TGF- β 1

Le TGF- β 1 est synthétisé sous forme de proprotéine hétérodimérique de 75 KDa. En effet, il est complexé de façon covalente avec le produit d'un second gène, le LAP (« latency-associated protein ») (Annes et al., 2003) ; (Pour une revue : (Schiller et al., 2004b)). Le LAP est clivé du TGF- β 1 mature dans le trans-Golgi, mais y reste cependant lié par des liaisons non covalentes. Des ponts disulfures sont formés entre des résidus cystéine du LAP et des résidus cystéine du LTBP (« latent-TGF- β 1-binding protein »). Le LTBP est un membre de la famille des protéines LTBP/fibrilline. Ce « latent large complex » (LLC) est ensuite associé par lien covalent à la matrice extracellulaire (figure 33). Le LLC, qui est donc constitué de trois composants (le TGF- β 1, le LAP et le LTBP), représente un senseur qui répond aux perturbations extracellulaires et couple ces événements à l'activation du TGF- β 1 latent. Le TGF- β 1 est l'effecteur car il permet l'activation de voies de signalisation située en aval, le LTBP est le localiseur car il interagit avec la matrice extracellulaire et le LAP est le détecteur car tous les mécanismes d'activation doivent agir sur cette protéine. En effet, le LAP fonctionne en tant qu'inhibiteur, le TGF- β 1 qui fait partie du LLC ne peut donc pas interagir avec ses récepteurs. L'activité du TGF- β 1 est donc régulée par conversion de la forme latente en forme active. Certains tissus peuvent contenir des quantités significatives de TGF- β 1 latent et l'activation de seulement une petite fraction de cette forme peut générer des réponses cellulaires importantes (Pour une revue : (Annes et al., 2003)).

c. Activation du TGF- β 1

Différents mécanismes conduisent à l'activation du TGF- β 1 et à sa libération du complexe latent. Par exemple les plasmines, la thrombospondine 1 et l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ interagissent directement avec le LAP. Le choc thermique ou les pH extrêmes dénaturent le LAP mais pas le TGF- β 1 (Annes et al., 2003). Les MMP 2 et 9 localisées en surface cellulaire permettent également d'activer le TGF- β 1 par protéolyse partielle de la forme latente (Yu and Stamenkovic, 2000). Il a également été démontré que les ROS permettent l'activation du TGF- β 1. Par exemple, le $\cdot\text{OH}$ peut mettre le LAP hors d'action par modification des acides aminés du LAP. Ce type de réponse permet de produire du TGF- β 1 durant des processus tel que l'inflammation et l'apoptose mais peut également endommager la matrice extracellulaire suite à la production de ROS (Annes et al., 2003).

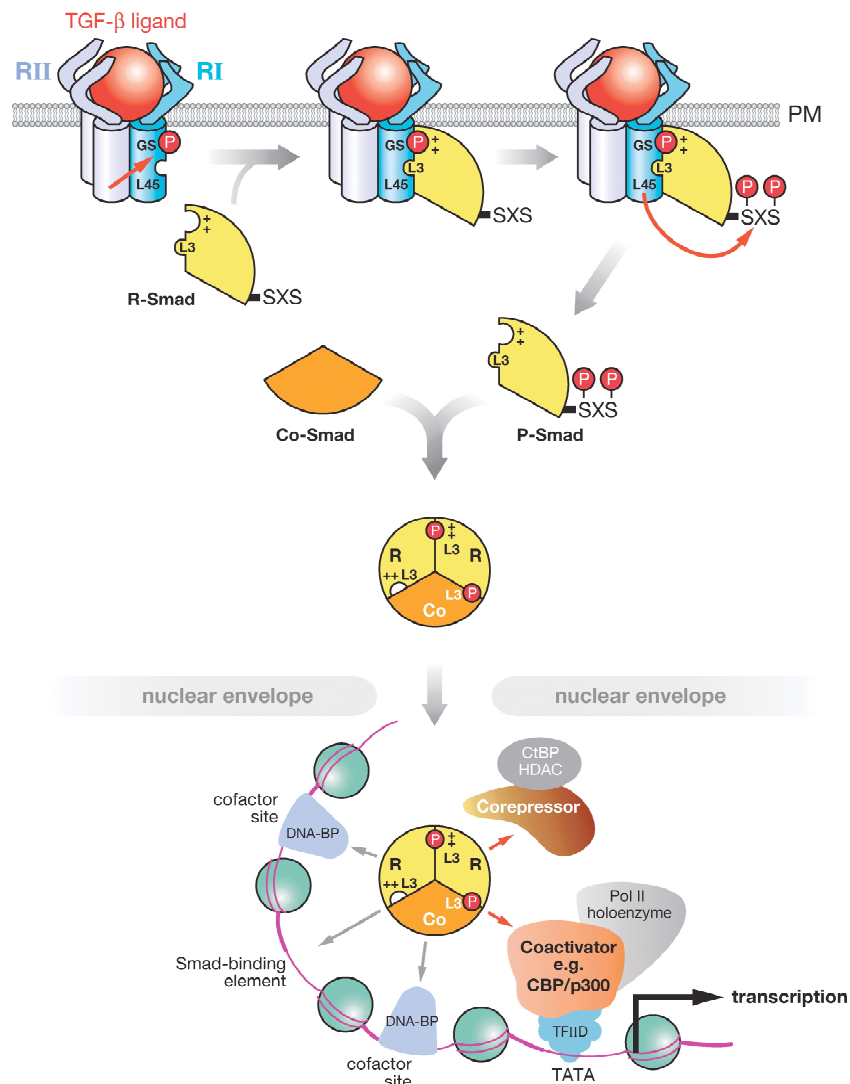


Figure 34 : Voies de signalisation du TGF- β 1 et des Smads. Le TGF- β 1 se lie à un homodimère de son récepteur de type II (T β RII) ou de type I (T β RI), ou à un hétérotétramère T β RII-T β RI. La liaison du ligand permet la stabilisation du complexe dans lequel le T β RII phosphoryle le T β RI. Après cette activation des récepteurs, les R-Smads (Smad2 et Smad3) sont recrutées au niveau de ce complexe. Elles peuvent être présentées au T β RI par des protéines de repliement telles que SRA (non représentée sur le schéma). Une interaction a alors lieu entre les boucles L45 du T β RI et L3 des Smads, qui sont ensuite phosphorylées. Ces Smads phosphorylées forment un complexe hétérotrimérique ou dimérique avec Smad4. Ce complexe de Smads est transloqué dans le noyau où il interagit avec l'ADN et des facteurs de transcription, ainsi que des co-activateurs et des corépresseurs (Feng *et al.*, 2005).

d. Les récepteurs du TGF- β 1

Le TGF- β 1 initie des voies de signalisation par liaison à ses récepteurs spécifiques situés en surface cellulaire (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)). Chez les mammifères, il existe 5 récepteurs de type II et 7 récepteurs de type I. Les récepteurs de type I et II (T β R-I et T β R-II), également nommés « activin-receptor-like kinases » (ALKs) sont transmembranaires et contiennent des domaines sérine/thréonine kinase du côté cytoplasmique (Pour une revue : (Verrecchia and Mauviel, 2007)). Pour chaque membre de la famille du TGF- β , il existe une combinaison caractéristique de T β R-I et T β R-II (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)). En absence de ligand, ces récepteurs se trouvent sous forme d'homodimères à la surface de la cellule. Le TGF- β 1 se lie à un homodimère de T β R-II et permet le recrutement d'un dimère de T β R-I pour former un complexe hétérotétramérique (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)). Les kinases des 2 types de récepteurs sont activées et permettent l'activation de différentes voies de signalisation situées en aval (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)).

e. Le TGF- β 1 et ses voies de signalisation

Le TGF- β 1 est l'isoforme la plus abondante parmi les membres de la famille de cette cytokine (Pour une revue : (Isufi et al., 2007)). Le TGF- β 1 active de nombreuses réponses cellulaires aussi diverses que la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)). Une fois activé, il permet l'activation de différentes voies de signalisation comme celles des Smads ou des PI3K (« phosphatidylinositol 3-kinase »), des Rho GTPases ou des MAPK. Les MAPK comprennent les ERK (« extracellular signal-regulated kinase »), JNK (« c-Jun N-terminal kinase ») et p38^{MAPK} (Pour une revue : (Souchelnytskyi, 2005)). Cette dernière protéine sera décrite plus bas dans le texte (point IV.3.B, page 34).

- ***Les Smads***

Il existe trois classes de protéines Smads. 1.- Les R-Smads (« receptor-activated ») comprennent les Smad2 et Smad3 et sont phosphorylées par le T β RI (figure 34). 2.- Suite à cette modification, les R-Smads interagissent avec un second groupe, les Co-Smads (« common partner »), pour former des complexes hétérodimériques qui pénètrent dans le noyau. La Co-Smad la plus commune est Smad4. Dans le noyau, les Smads activent ou répriment la transcription par leur capacité intrinsèque à lier l'ADN (au niveau du domaine SBE (« Smad3/4-binding element ») constitué de 4 paires de base : 5'-AGAC-3') ainsi que par interaction avec des facteurs de transcription liés à l'ADN. Elle peuvent par exemple s'associer avec p53, qui lui

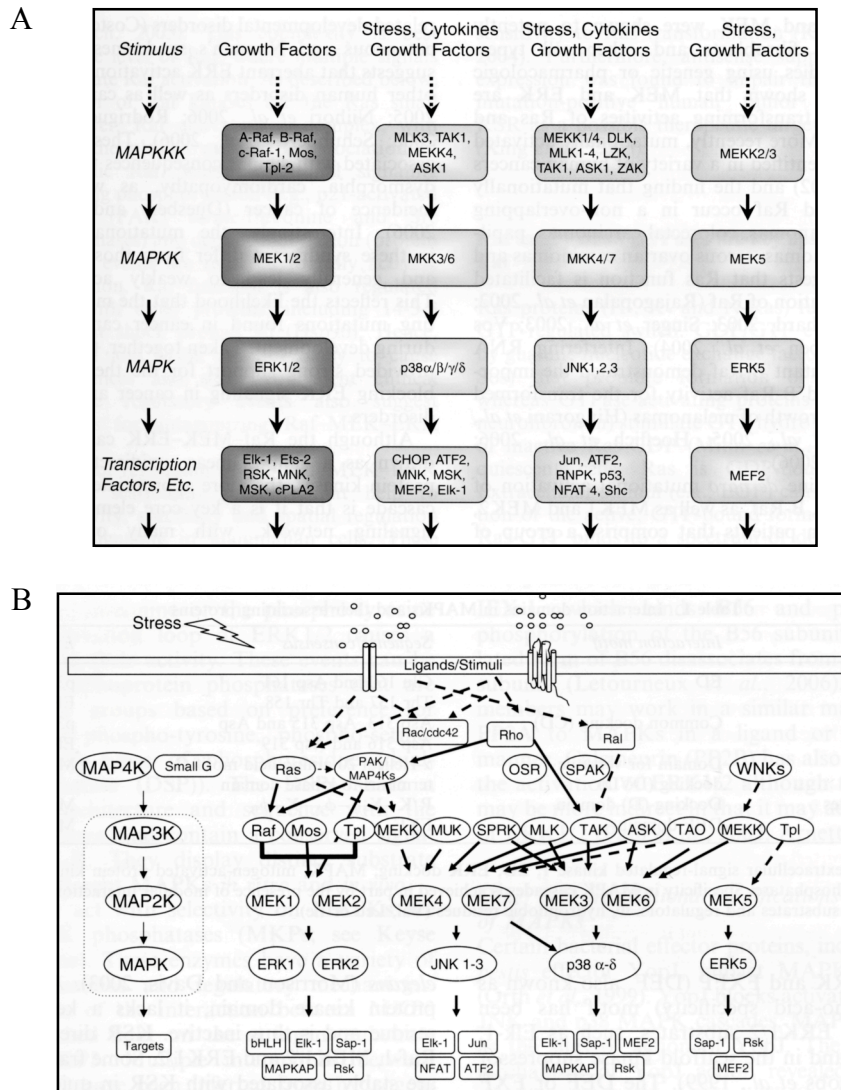


Figure 35 : Voies de signalisation des MAPK.

A : Après stimulation, l'activation des ERKs, JNK et p38^{MAPK} par phosphorylation est dépendante de l'activité des protéines kinase kinases situées en amont. Les trois principales kinases dans la cascade des MAPK sont les MAPKKK (MAPK kinase kinases), les MAPKK (MAPK kinases) et les MAPK. Au total, 12 isoformes de MAPK sont connues. Toutes les MAPK possèdent une séquence d'acides aminés commune thréonine-Xxx-tyrosine pour laquelle le X diffère en fonction des isoformes des MAPK. Ce motif phosphorylable est situé dans une boucle d'activation proche des sites de liaison des substrats et de l'ATP. La phosphorylation a lieu en premier lieu au niveau de la tyrosine puis de la thréonine. La MAPKK se dissocie de la MAPK entre chaque étape. Les MAPKs peuvent phosphoryler et activer une large variété de substrats, comme des facteurs de transcription et d'autres kinases à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Ce processus a lieu en plusieurs étapes. La protéine substrat lie par exemple p38^{MAPK} au niveau de la « poche à substrat », l'ATP est ensuite lié au niveau de la « poche à ATP ». Le substrat et l'ATP interagissent l'un avec l'autre afin d'assurer une liaison ferme. Cela conduit à une augmentation ou une diminution de l'expression de certains gènes cibles et donc à une réponse biologique adaptée (Roberts *et al.*, 2007).

B : Différents signaux extracellulaires peuvent engendrer des réponses tissu-spécifiques ou stimulus-spécifiques par activation de une ou plusieurs voies de MAPK. De plus, les différentes voies des MAPK interfèrent les unes avec les autres (Raman *et al.*, 2007).

aussi peut être activée par le TGF- β 1, ou avec des coactivateurs comme p300 et CBP (Creb-binding protein) (Cordenonsi et al., 2003); (Pour une revue : (Feng and Derynck, 2005)). 3.- Le troisième groupe des Smads est composé des Smad6 et Smad7, qui forment un complexe stable avec le récepteur T β RI et empêche la phosphorylation des R-Smads. De plus, ces Smads recrutent les ubiquitine-ligases afin d'induire la dégradation du T β RI. Les Smad6 et Smad7 peuvent également recruter la protéine phosphatase 1 (PP1) au niveau du complexe des récepteurs, ce qui permet la déphosphorylation et donc l'inactivation des récepteurs via la sous-unité catalytique de PP1 : GADD45 (Pour une revue : (Feng and Derynck, 2005)). Smad7, qui est activée par liaison directe de Smad3 et Smad4 sur son promoteur, permet une rétro-régulation négative de la voie du TGF- β 1 (Pour une revue : (Isufi et al., 2007; Verrecchia and Mauviel, 2007)).

En plus d'être activée par le T β RI, les Smads peuvent être phosphorylées par des kinases cytoplasmiques comme les ERK, les JNK, CDK2 et CDK4 ou les PKC. En fonction du type cellulaire et du contexte physiologique, ces autres kinases impliquées dans d'autres voies de signalisation induisent des effets différents en ciblant les divers sites phosphorylables des Smads. La combinaison de ces événements de phosphorylation contribuent à la réponse finale de l'expression de gènes en réponse aux Smads (Pour une revue : (Feng and Derynck, 2005)).

- Les ERK, les JNK et les PI3K

Les ERK et JNK font partie de la famille des MAPK avec les BMK1 (« ERK5/big MAP kinase 1 ») et p38^{MAPK} (figure 35) (Pour une revue : (Raman et al., 2007; Roberts and Der, 2007)). Ces protéines induisent un réseau complexe de signaux qui, après diverses stimulations, conduisent à une variété de réponses cellulaires. Alors que les ERK représentent des composants centraux des voies de signalisation induites après stimulation avec des facteurs de prolifération, les JNK sont activées en réponse à de nombreux stress comme les stress oxydatifs ou une forte osmolarité (Pour une revue : (Raman et al., 2007)). Les BMK1 (ERK5) induisent l'expression de gènes de réponse précoce au sérum (« early response genes »). p38^{MAPK} régule la réponse cellulaire face à des stress tel que les UV ou les stress oxydatifs (Pour une revue : (Ono and Han, 2000; Raman et al., 2007)).

Les mécanismes d'activation des ERK et des JNK par le TGF- β 1 sont peu caractérisés. L'activation rapide de Ras par le TGF- β 1 dans des cellules épithéliales pourrait expliquer que celui-ci permet l'activation des ERK. Les JNK sont activées par de nombreuses MAPKKK (« MAPK Kinase Kinases ») en réponse à de nombreux stimuli. Le TGF- β 1 peut activer la

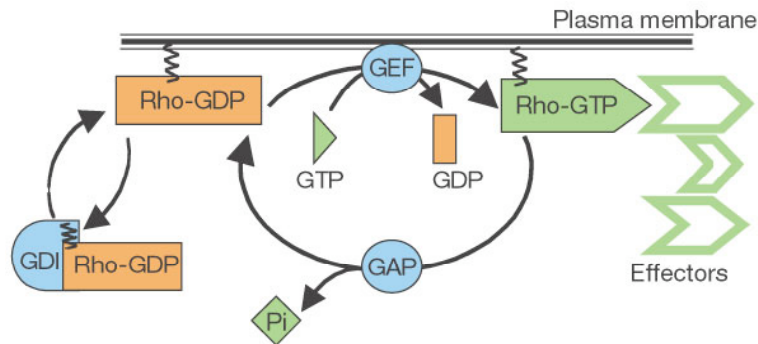


Figure 36 : Cycle des RhoGTPases. Les RhoGTPases réalisent un cycle en passant de la conformation active (liée au GTP) à la forme inactive (liée au GDP). Lorsqu'elles sont actives, elles reconnaissent leurs cibles protéiques (effectors) afin d'activer des voies de signalisation. Ce cycle est régulé par trois types de protéines. Les protéines GEF catalysent l'échange du GDP en GTP ; les GAP stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP ; les GDI entraînent la relocalisation des RhoGTPases dans le cytoplasme. Toutes les RhoGTPases sont prénylées du côté C-terminal (Etienne-Manneville et Hall, 2002).

TAK1 (« TGF- β -activated kinase »), un membre de la famille des MAPKKK. De plus, MEKK1 permet l'activation de MAPKKK situées en aval du TGF- β 1. Ensemble, MEKK1 et TAK1 pourraient activer les JNK à travers MKK4 (Raman et al., 2007). L'activation des ERK et des JNK par le TGF- β 1 peut résulter en la phosphorylation des Smads. De plus, l'activation de la voie Ras/ERK peut induire la surexpression du TGF- β 1 et donc amplifier la réponse de celui-ci ainsi qu'induire des réponses secondaires dépendantes de cette cytokine. L'activation des MAPK par le TGF- β 1 peut aussi affecter les réponses de transcription via la régulation de facteurs de transcription qui interagissent avec les Smads, par exemple le substrat de JNK : c-Jun. Ceci permet la convergence des voies des Smads et des voies des MAPK (pour une revue : (Derynck and Zhang, 2003)).

Le TGF- β 1 peut également activer Akt par phosphorylation afin d'induire la transformation de cellules épithéliales ou la migration de cellules endothéliales (Bakin et al., 2000; Vinals and Pouyssegur, 2001). Cette activation de Akt par le TGF- β 1 peut se faire via l'intermédiaire de RhoA (Bakin et al., 2000) ou peut résulter de l'induction de l'expression du TGF- α par le TGF- β 1 et en conséquence l'activation des récepteurs à l'EGF (« epidermal growth factor ») (Vinals and Pouyssegur, 2001).

- Les Rho GTPases

Les GTPases contrôlent de nombreux processus cellulaires. Ces protéines passent par deux états de conformation différents : soit ces GTPases sont liées à un GTP (« guanosine triphosphate ») et sont dans un état actif ; soit elles sont liées à un GDP (« guanosine diphosphate ») et sont inactives (figure 36). Les protéines GTPases ont la capacité d'hydrolyser le GTP en GDP. Lorsque les GTPases sont liées au GTP, elles reconnaissent des protéines cibles afin de générer une réponse jusqu'à ce que l'hydrolyse du GTP conduise la GTPase en conformation inactive. Plusieurs centaines de familles et superfamilles de GTPases sont connues chez les cellules de mammifères, comme par exemple la superfamille de Ras. Dans cette superfamille, on compte plus de 100 petites GTPases monomériques qui sont répertoriées selon 5 groupes majeurs : Ras, Rho, Rab, Arf et Ran. Le groupe des Rho GTPases est régulé par différents types de protéines. Les GEF (« guanine nucleotide exchange factor ») favorisent l'échange d'un GDP avec un GTP. Les GAP (« GTPase activating protein ») activent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GDI (« guanine dissociation inhibitor ») bloquent l'échange GDP/GTP. Les trois RhoGTPases les mieux caractérisées sont les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42. Plus de 60 cibles protéiques ont été identifiées expérimentalement pour RhoA, Rac1 et

Cdc42. Ce nombre élevé de protéines cibles reflète la complexité des voies régulées par les Rho GTPases ainsi que l'importance de RhoA, Rac1 et Cdc42 chez les cellules eucaryotes. L'activation constitutive de RhoA et Rac1 par mutation permet respectivement l'assemblage de filaments contractiles d'actine et de myosine (fibres de stress) et des protrusions riches en actine en surface cellulaire (lamellipodes). Cdc42, quant à elle, permet la formation d'extensions membranaires en forme de doigt et riches en actine (filipodes). La conclusion que RhoA, Rac1 et Cdc42 induisent 3 voies de signalisation différentes afin de faire le lien entre les récepteurs membranaires et l'assemblage de structures d'actine filamenteuses distinctes a ensuite été confirmée chez une variété de types cellulaires humains ainsi que chez la levure, *C. elegans* et la drosophile.

Contrairement à cela, peu d'études fonctionnelles ont été réalisées sur les autres membres de la famille des RhoGTPases.

En plus de la stabilisation du cytosquelette d'actine, RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans d'autres voies de signalisation permettant la polarité cellulaire, la transcription de gènes, la progression du cycle cellulaire en phase G1, des voies de transport vésiculaires et l'activation d'une variété d'enzymes comme la NADPH oxydase des phagocytes. Cette liste d'activités est longue et reflète le grand nombre de cibles régulées par les RhoGTPases (Pour une revue : (Etienne-Manneville and Hall, 2002)).

En fonction du type cellulaire, le TGF- β 1 peut rapidement activer des Rho GTPases comme RhoA, Rac1 et Cdc42. L'activation des petites GTPases par le TGF- β 1 peut jouer un rôle dans la réponse d'expression de gènes (Atfi et al., 1997). Ces protéines entraînent les changements de l'organisation du cytosquelette dépendants TGF- β 1 et la transdifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (Pour une revue : (Derynck and Zhang, 2003)).

IV.3.B. p38^{MAPK}

a. Description

Par son implication dans la réponse cellulaire face aux stress oxydatifs, p38^{MAPK} est impliquée dans l'inflammation, la prolifération, la différenciation et le cycle cellulaire (New and Han, 1998) ; (Pour une revue : (Herlaar and Brown, 1999; Ono and Han, 2000)). Cinq isoformes de p38^{MAPK} ont été identifiées et peuvent être classées selon 2 groupes : p38 $\alpha/\beta/\beta$ 2 et p38 γ/δ (Kumar et al., 1997; Lee et al., 1994; Wang et al., 1997). Les isoformes α et β sont exprimées de façon ubiquitaire alors que l'isoforme γ est synthétisée dans les muscles squelettiques et l'isoforme δ est exprimée dans le poumon, le rein, le testicule, le pancréas et le petit intestin. Ces

isoformes de p38^{MAPK} présentent 60 % d'identité entre elles et seulement 40 à 45 % d'identité par rapport aux autres MAPK.

b. Activation et régulation

L'activation de p38^{MAPK} a été observée dans différents types cellulaires suite à la stimulation avec des facteurs de prolifération (FGF (« fibroblast growth factor »), IL-3 (« interleukin-3 »), IL-2, IGF (« insulin-like growth factor »), VEGF (« vascular endothelial growth factor »), PDGF), suite à une stimulation par le TGF-β1, ou en réponse à l'étirement des cellules, etc. (Pour une revue : (Ono and Han, 2000)). Une étude a montré que la stimulation de cellules épithéliales avec du TGF-β1 active la voie TAK1/MKK6/p38^{MAPK}, ce qui permet la phosphorylation de ATF2 (activating transcription factor2). En parallèle, la voie des Smads est activée, ce qui conduit à l'accumulation nucléaire de Smad4. ATF2 phosphorylé et Smad4 s'associent, et ce complexe active la transcription des gènes dépendants du TGF-β1. Il semble que ATF2 peut stabiliser le complexe Smad-ADN d'une manière ligand-dépendante (Hanafusa et al., 1999). p38^{MAPK} est également activée suite à un traitement de cellules lymphoïdes ou de FDHs avec une faible concentration de H₂O₂ (de 20 à 450 μM) permettant un arrêt de prolifération sans induire l'apoptose (Iwasa et al., 2003; Kurata, 2000). En fait, il semble que p38^{MAPK} joue un rôle dans la sénescence induite par un stress oxydatif, mais également lors de la sénescence induite par un raccourcissement des télomères (sénescence répllicative) ou suite à l'expression de Ras oncogénique. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur chimique de p38^{MAPK} (SB203580) réduit l'augmentation de la proportion de cellules présentant une activité SA β-gal et réduit la diminution de potentiel prolifératif observé chez des FDHs sénescents. Les auteurs proposent donc que p38^{MAPK} représente un composant important des voies de signalisation permettant l'établissement de la sénescence de FDHs dépendante ou indépendante du raccourcissement des télomères (Iwasa et al., 2003). Néanmoins, l'expression et l'activation des différentes isoformes de la famille p38^{MAPK} sont régulées différemment dans les différents types cellulaires et tissus (Ono and Han, 2000). Il reste donc à déterminer l'implication de chacune de ces isoformes dans le processus de la sénescence.

Notons également que les isoformes α et β de p38^{MAPK} sont inhibées par des MAP kinase phosphatases comme MKP1, MKP4 et MPK5 qui induisent la déphosphorylation de p38^{MAPK} (Ono and Han, 2000).

- Les MAPKK

Malgré le double site de phosphorylation conservé (Thr 180/Tyr 182) entre les différentes isoformes de $p38^{\text{MAPK}}$, leur activation est sélective. $p38\alpha^{\text{MAPK}}$ peut être activée par MKK3, MKK4, MKK6 alors que les isoformes β et γ peuvent être activées par MKK6 tandis que l'isoforme δ peut être activée par MKK3, MKK4, MKK6, MKK7 et les JNK. D'autres MAPKK comme TAK1, MLK2 et MLK3 induisent également l'activation de $p38^{\text{MAPK}}$ (Pour une revue : (Ono and Han, 2000)).

- Ras et les RhoGTPases

Ras peut participer à l'activation de $p38^{\text{MAPK}}$ dans différents modèles cellulaires (Deng et al., 2004; McDermott and O'Neill, 2002). Il a notamment été montré que les voies de signalisation de Ras permettent d'induire la sénescence prématurée de fibroblastes par activation essentielle de $p38^{\text{MAPK}}$ via MKK3 /MKK6 (Deng et al., 2004; Serrano et al., 1997; Wang et al., 2002).

De plus, les protéines Rac1 et Cdc42 de la famille des Rho GTPases sont des régulateurs potentiels de $p38^{\text{MAPK}}$ (Bagrodia et al., 1995; Seo et al., 2004; Zhang et al., 1995). Par exemple, après exposition de cellules rénales et de kératinocytes aux UVC, $p38^{\text{MAPK}}$ est activée par deux voies différentes. La première est dépendante de Rac1 et permet la phosphorylation immédiate et transitoire de $p38^{\text{MAPK}}$. La seconde est retardée, maintenue et est dépendante d'une voie impliquant le récepteur à l'EGF, Ras, β -Pix, Cdc42 et MKK3/6 (Seo et al., 2004). D'autres études suggèrent que Rac1 et Cdc42 induisent une cascade de kinases initiée au niveau de la protéine PAK1, PAK2 ou PAK3 (« p21-activated protein kinase1 ») afin d'activer $p38^{\text{MAPK}}$ (Bagrodia et al., 1995; Zhang et al., 1995). Contrairement à cela, une étude réalisée sur des FDHs de peau démontre que le silençage de Cdc42 par l'utilisation de siRNA permet une augmentation de la phosphorylation de $p38^{\text{MAPK}}$ (Deroanne et al., 2005).

Puisque les protéines MLK1, MLK2 et MLK3 contiennent également un domaine CRIB (« Cdc42/Rac1 interactive binding »), ces protéines pourraient jouer le rôle de protéines intermédiaires entre Rac1/Cdc42 et $p38^{\text{MAPK}}$ (Nagata et al., 1998; Tibbles et al., 1996). Il est également à noter que, suite à une stimulation de fibroblastes embryonnaires avec du $\text{TNF-}\alpha$, les protéines Cdc42 et $p38^{\text{MAPK}}$ sont activées séquentiellement de manière à induire un effet antagoniste sur la formation de filopodes (Gadea et al., 2004). En effet, Cdc42 est activée dans les temps courts qui suivent le traitement des cellules avec du $\text{TNF}\alpha$, ce qui engendre la formation de filopodes par ces cellules. À plus long terme après cette stimulation avec du $\text{TNF}\alpha$,

<i>MAPKs</i>	<i>Transcription factors</i>
ERK1,2	Sap-1a (Strahl <i>et al.</i> , 1996; Galanis <i>et al.</i> , 2001) ELK-1 (Yang <i>et al.</i> , 1998) SMAD-1 (Kretschmar <i>et al.</i> , 1997) SMAD-2,3 (Kretschmar <i>et al.</i> , 1999) SMAD4 (Roelen <i>et al.</i> , 2003) MAF-A (Benkhelifa <i>et al.</i> , 2001) p53 (Wang and Shi, 2001) c-Myb (Vorbrueggen <i>et al.</i> , 1996) SP1 (Milanini-Mongiat <i>et al.</i> , 2002) c-Myc (Sears <i>et al.</i> , 1999) c-Fos (Monje <i>et al.</i> , 2003)
JNK 1,2	c-Jun (Pulverer <i>et al.</i> , 1991) ATF-2 (Gupta <i>et al.</i> , 1995; Davis, 2000) ELK-1 (Whitmarsh <i>et al.</i> , 1995) JunD (Gupta <i>et al.</i> , 1995; Davis, 2000) ELK-3 (Ducret <i>et al.</i> , 2000) p53 (Buschmann <i>et al.</i> , 2001) c-Myc (Noguchi <i>et al.</i> , 1999) HSF-1 (Dai <i>et al.</i> , 2000) NFAT4 (Chow <i>et al.</i> , 1997)
ERK5	MEF2A (Marinissen <i>et al.</i> , 1999) MEF2C (Kato <i>et al.</i> , 1997; Marinissen <i>et al.</i> , 1999) c-Fos (Terasawa <i>et al.</i> , 2003) Fra-1 (Terasawa <i>et al.</i> , 2003) Sap1a (Kamakura <i>et al.</i> , 1999) CREB (Watson <i>et al.</i> , 2001) Ets-1 (Dwivedi <i>et al.</i> , 2002) c-Myc (English <i>et al.</i> , 1998)
p38 α	ATF-2 (Jiang <i>et al.</i> , 1996; Zarubin and Han, 2005) c-Fos (Tanos <i>et al.</i> , 2005) p53 (Sanchez-Prieto <i>et al.</i> , 2000) p73 (Sanchez-Prieto <i>et al.</i> , 2000) MEF2 A, C (Yang <i>et al.</i> , 1999) STAT-4 (Visconti <i>et al.</i> , 2000) ELK-1 (Yang <i>et al.</i> , 1998) Sap-1a (Galanis <i>et al.</i> , 2001) CHOP (Wang <i>et al.</i> , 1996; Zarubin and Han, 2005)
p38 β	ATF-2 (Jiang <i>et al.</i> , 1996; Zarubin and Han, 2005) c-Fos (Tanos <i>et al.</i> , 2005) MEF2 A, C (Yang <i>et al.</i> , 1999) ELK-1 (Yang <i>et al.</i> , 1998)
p38 γ	c-Fos (Tanos <i>et al.</i> , 2005) ELK-1 (Yang <i>et al.</i> , 1998)
p38 δ	ATF-2 (Hu <i>et al.</i> , 1999) c-Fos (Tanos <i>et al.</i> , 2005) c-Jun (Hu <i>et al.</i> , 1999)

Abbreviations: ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase.

Figure 37 : Liste de facteurs de transcription régulés par les différentes MAPK (Turjanski *et al.*, 2007).

Gene	Name	Genbank accession number	24 h after stress H ₂ O ₂	+SB203580	72 h after stress H ₂ O ₂	+SB203580
(A) Genes overexpressed (CTL ± SB203580 = 1.00)						
<u>Apoptosis/inflammation</u>						
BCLX	B-cell lymphoma 2	NM_000633			1.47 ± 0.28	1.08 ± 0.22
IL11	Interleukin 11	NM_000641			1.58 ± 0.23	0.44 ± 0.15
<u>DNA synthesis/cell cycle regulation</u>						
H2B/S	Histone 2b member B/S consensus	NM_080593			2.66 ± 0.24	1.72 ± 0.25
ID2	Inhibitor of DNA binding 2	M97796	1.77 ± 0.14	0.76 ± 0.14		
<u>Defense system/stress response</u>						
AOP2	Anti-oxidant-protein2	NM_004905			1.55 ± 0.14	0.72 ± 0.11
GPX	Glutathione peroxidase	M21304			1.49 ± 0.22	1.19 ± 0.23
HSP90-alpha	Heat shock 90 kD alpha	X15183	1.82 ± 0.29	0.98 ± 0.34		
<u>Growth factors</u>						
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750			1.57 ± 0.21	0.54 ± 0.14
HBEGF	Heparin binding epidermal growth factor	M60278	1.54 ± 0.06	1.05 ± 0.08		
IGFBP2	Insulin growth factor binding protein 2	M35410			2.44 ± 0.57	1.49 ± 0.32
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein 3	X64875			1.97 ± 0.51	0.88 ± 0.09
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062			2.55 ± 1.46	1.29 ± 0.27
<u>Morphology/cellular adhesion</u>						
SM22	Transgelin	M95787			2.01 ± 0.37	1.10 ± 0.05
TPA	Tissue plasminogen activator	NM_000930			1.45 ± 0.32	0.95 ± 0.13
<u>Protein degradation</u>						
MMP2	Matrix metalloproteinase 2	NM_004530			1.84 ± 0.32	1.43 ± 0.38
MMP14	Matrix metalloproteinase 14	NM_004995			1.81 ± 0.33	0.86 ± 0.20
PLAU	Urokinase	NM_002658	1.75 ± 0.32	0.70 ± 0.17		
(B) Genes repressed (CTL ± SB203580 = 1.001)						
<u>Apoptosis/inflammation</u>						
CASP8	Caspase 8	X98172			0.41 ± 0.02	0.81 ± 0.07
COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase 1	NM_000962	0.45 ± 0.02	0.93 ± 0.19		
<u>DNA synthesis/cell cycle regulation</u>						
E2F1	E2F transcription factor 1	NM_005225	0.22 ± 0.00	0.35 ± 0.02		
H4FM	Histone 4 member M consensus	NM_003495			0.27 ± 0.01	0.62 ± 0.06
TK1	Thymidine kinase	NM_003258	0.18 ± 0.00	0.37 ± 0.02		
TYMS	Thymidylate-synthetase	NM_001071			0.50 ± 0.02	0.32 ± 0.01
<u>Defense system/stress response</u>						
ADPRT	Polysynthetase	J03473	0.36 ± 0.02	0.66 ± 0.13		
RRAS	R-ras	NM_006270	0.56 ± 0.03	0.85 ± 0.12		
<u>Growth factors</u>						
CTGF	Connective tissue growth factor	U14750	0.53 ± 0.02	0.87 ± 0.21		
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein 5	M65062	0.43 ± 0.04	0.93 ± 0.05		
<u>Morphology/cellular adhesion</u>						
FN1	Fibronectin	X02761	0.36 ± 0.01	0.50 ± 0.02		
Oste	Osteonectin	NM_003118	0.59 ± 0.08	0.93 ± 0.08		
SM22	Transgelin	M95787	0.38 ± 0.03	0.92 ± 0.26		
THBS1	Thrombospondin	X14787	0.24 ± 0.00	0.34 ± 0.00		
TPA	Plasminogen activator tissue	NM_000930	0.48 ± 0.03	0.84 ± 0.20		
<u>Protein degradation</u>						
MP1	Metalloprotease 1	AF061243	0.64 ± 0.08	0.95 ± 0.15		
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	NM_003254	0.65 ± 0.03	0.90 ± 0.15		
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	0.52 ± 0.02	0.98 ± 0.23		

Figure 38 : Liste des transcrits présentant une augmentation (A) ou une diminution (B) d'abondance à 24 ou 72 h après traitement des FDHs IMR-90 hTERT avec H₂O₂ (200 μM) +/- un inhibiteur de p38^{MAPK} SB203580 (20 μM). Une partie de ces résultats a été vérifiée en remplaçant l'inhibiteur chimique par un siRNA de p38^{MAPK} (d'après Zdanov *et al.*, 2006).

p38^{MAPK} est activée à son tour, permet la stabilisation de p53 par phosphorylation et son activité transactivatrice, conduisant à l'inhibition de la formation de filipodes. Ceci entraîne donc un blocage de la migration des cellules suite à la stimulation avec du TNF- α (Gadea et al., 2004).

c. Substrats

Parmi les substrats de p38^{MAPK}, on retrouve essentiellement des protéines kinases et des facteurs de transcription (Pour une revue : (Ono and Han, 2000; Turjanski et al., 2007)).

- Protéines kinases

MAPKAP2 et MAPKAP3 activées par p38^{MAPK} peuvent à leur tour phosphoryler divers substrats comme HSP27, ATF1, ATF2, SRF (Heidenreich et al., 1999; Ouwens et al., 2002; Stokoe et al., 1992; Tan et al., 1996). MNK1 (« MAPK interaction protein kinase »), PRAK (« p38 regulated/activated kinase ») et MSK (« Mitogen- and stress-activated kinase ») sont d'autres kinases substrats de p38^{MAPK} qui peuvent phosphoryler respectivement eIF-4E, HSP27 et CREB (Pour une revue : (Ono and Han, 2000)). De plus, les voies de signalisation dépendantes de p38^{MAPK} permettraient une boucle de régulation négative de Ras, et donc des signaux de prolifération, après avoir été activés par cette protéine (Chen et al., 2000a).

- Facteurs de transcription

ATF2, ATF1, SRF, p53 font partie des facteurs de transcription activés par phosphorylation via p38^{MAPK} (figure 37) (Pour une revue : (Ono and Han, 2000)). Par exemple, p53 est phosphorylée par p38^{MAPK} après exposition de cellules épidermiques ou de cellules de carcinomes de poumons humains aux UVC (Bulavin et al., 1999; Huang et al., 1999). Une centaine de gènes sont connus pour être régulé via les signaux transduits par p38^{MAPK}. Récemment, une étude réalisée sur des FDHs IMR-90 exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) a montré l'implication de p38^{MAPK} dans l'induction ou la répression de l'expression de gènes après un traitement avec une concentration sublétales de H₂O₂ induisant la SIPS (figure 38) (Zdanov et al., 2006). Un damier à ADN à basse densité a été généré pour étudier l'abondance relative de 240 gènes associés à la sénescence. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec des FDHs IMR-90 hTERT placés en présence d'un inhibiteur de p38^{MAPK} (SB203580) ou lorsque p38^{MAPK} est silencée par utilisation de siRNA. Cette étude a donc permis de déterminer des changements d'abondance de transcrits qui sont régulés par

p38 α ^{MAPK} lors de l'établissement de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 hTERT induite par H₂O₂.

IV.3.C. Induction du TGF- β 1 et activation de p38^{MAPK} lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 induite par H₂O₂

En 1995, il a été démontré que la stimulation de FDHs IMR-90 avec du TGF- β 1 entraîne la génération de H₂O₂ extracellulaire par activation d'une NADH oxydase (qui ne présente pas d'activité NADPH oxydase) située en surface cellulaire. Cette production de H₂O₂ est dépendante de la traduction de nouvelles protéines (comme des protéines tyrosine kinases) et est maintenue durant plusieurs heures après la stimulation avec le TGF- β 1 (Thannickal and Fanburg, 1995). Cette capacité de générer H₂O₂ est donc différente de celle qui est observée après une stimulation avec du PDGF ou du FGF, lesquels induisent une production intracellulaire de H₂O₂ de façon rapide et courte (Thannickal et al., 1998). La production de H₂O₂ intracellulaire générée par stimulation cellulaire avec ces facteurs de croissance semble être dépendante d'une NADPH oxydase, ce qui entraîne la propagation de signaux mitogéniques intracellulaires.

Chez les FDHs IMR-90, p38^{MAPK} est phosphorylée après au plus tard 15 minutes de traitement avec H₂O₂ à une concentration sublétales. L'activation de p38^{MAPK} permet l'induction du TGF- β 1 via activation du facteur de transcription ATF2. Le TGF- β 1 est sécrété à 36 h après le traitement avec H₂O₂. Du TGF- β 1 latent et actif a été observé en surface de FDHs en sénescence prématurée induite par les UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005) et par le *t*-BHP (Pascal, 2006). L'activation de son récepteur de type II permet de maintenir les phosphorylations de p38^{MAPK} et de ATF2. Une boucle de rétroaction positive s'établit donc entre la surexpression du TGF- β 1 et l'activation de p38^{MAPK}. De plus, ATF2 phosphorylé interagit avec Rb, qui devient alors hypophosphorylée (Fripiat et al., 2002). Cette hypophosphorylation est médiée en partie par une diminution de l'activité kinase de CDK2 (Fripiat et al., 2003). Ces mécanismes permettent alors l'apparition de la morphologie sénescence, de la SA- β gal et l'abondance plus élevée des ARNm de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22 à 3 jours après le traitement (Dumont et al., 2000b; Fripiat et al., 2002). Une étude protéomique réalisée sur ce même type cellulaire montre que les trois isoformes du TGF- β (1, 2 et 3) ainsi que les récepteurs de type I et II sont plus abondants chez les cellules en sénescence répliquative comparées aux cellules jeunes. La voie du TGF- β 1 et la voie des Smads induisent l'induction du CTGF (« connective tissue growth factor »), une protéine marqueur de la sénescence répliquative chez les fibroblastes (Kim et al., 2004).

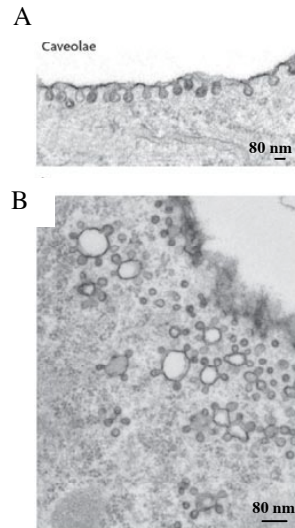


Figure 39 : Structure des cavéoles.

Les cavéoles sont des puits discrets de forme circulaire ou en forme de flacon.

A et B : Micrographies d'observations électroniques des cavéoles présentes chez des adipocytes faites au MET (d'après Parton *et al.*, 2007).

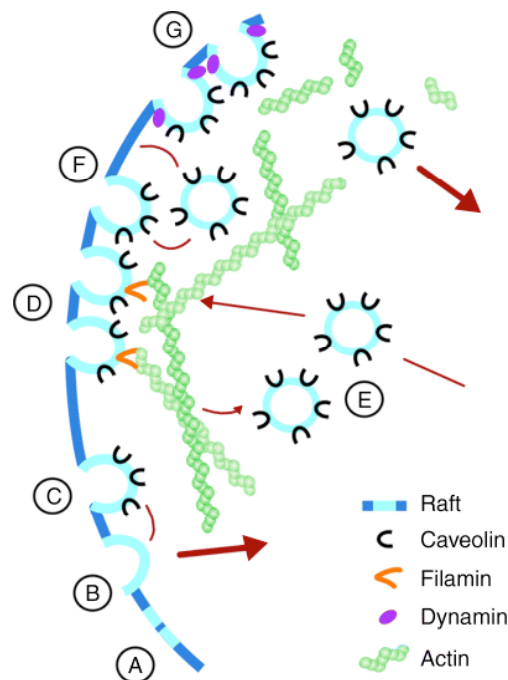


Figure 40 : Modèle représentant le rôle des cavéoles et des « lipids-rafts » non-cavéolaires dans le processus d'endocytose. Les petits « lipids-rafts » (A) peuvent fusionner pour former des structures endocytaires plus larges (B). La cavéoline réduit la capacité endocytairre de ces structures (C) et lie le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la filamine, ce qui rend les cavéoles relativement immobiles (D). Toutefois, les cavéoles peuvent être internalisées (E). La fission et fusion membranaires peuvent avoir lieu (F). Dans certaines circonstances particulières, l'internalisation des cavéoles peut également avoir lieu (G). Ce processus implique une importante réorganisation du cytosquelette d'actine et conduit à un mouvement simple des cavéoles membranaires (Hommelgaard *et al.*, 2005).

De plus, p38^{MAPK} est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire observé chez les FDHs IMR-90 en sénescence prématurée, indépendamment du TGF- β 1, dans les premières heures qui suivent le traitement H₂O₂. En effet, lorsque les FDHs IMR-90 sont placés en présence d'anticorps neutralisant le TGF- β 1, le blocage du cycle cellulaire est toujours observé après traitement avec H₂O₂.

Lors de ce traitement neutralisant le TGF- β 1, l'induction des 4 gènes marqueurs cités plus haut n'est pas totalement bloquée (Fripiat et al., 2002). Ceci laisse donc penser que le TGF- β 1 n'est pas le seul effecteur intervenant dans l'apparition de la SIPS.

Peu de données sont donc actuellement disponibles en ce qui concerne les voies de transduction situées en aval de p38^{MAPK} suite au traitement des FDHs avec H₂O₂ à concentration sublétales. Une étude a démontré en 2001 que la cavéoline 1 est phosphorylée sur la tyrosine 14 chez des fibroblastes murins NIH3T3 exposés à différents types de stress comme une osmolarité élevée, la présence de H₂O₂ ou une exposition aux UV. Cette phosphorylation est dépendante de p38^{MAPK} (Volonte et al., 2001).

IV.3.D. La cavéoline

a. Les cavéoles

Les cavéoles sont des puits de 60 à 80 nm de diamètre et sont formées par des invaginations de la membrane plasmique (figure 39). Elles se présentent avec la forme caractéristique d'un flacon sans manteau. Cela les différencie donc des puits couverts de clathrine (Pour une revue : (Parton and Simons, 2007)). Ces structures sont très abondantes dans certains types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les adipocytes. Les cavéoles sont impliquées dans l'endocytose, la transcytose, les voies de signalisation du calcium et dans de nombreux événements de signalisation (figure 40) (Pour une revue : (Williams and Lisanti, 2004) ; (Parton and Simons, 2007)).

Les cavéoles forment une unité stable, fonctionnelle et spécialisée et sont générées et stabilisées par oligomérisation de la cavéoline, de protéines associées et de lipides. Il a été démontré que 144 molécules de cavéoline sont présentes au sein d'une cavéole alors que les molécules de cholestérol sont estimées être 100 fois plus nombreuses (Park et al., 2000) ; (Pour une revue : (Parton and Simons, 2007)). Quelques molécules de glycosphingolipide et sphingomyéline sont présentes dans les cavéoles de la membrane plasmique (Park et al., 2000). Ainsi, la densité lipidique est plus importante dans les cavéoles que dans la fraction de membrane plasmique pour laquelle les cavéoles ont été isolées. La déplétion en cholestérol entraîne la destruction des

Le « scaffolding domain » (CSD) est impliqué dans la liaison et l'inhibition des GPCRs (« G-protein-coupled receptors »), des protéines G, d'enzymes effectrices, de récepteurs à activité tyrosine kinase et de tyrosine kinase non récepteur. Le domaine d'oligomérisation (OD) est impliqué dans la formation d'omo- et d'hétéro-oligomères entre les isoformes de la cavéoline (Head *et al.*, 2007).

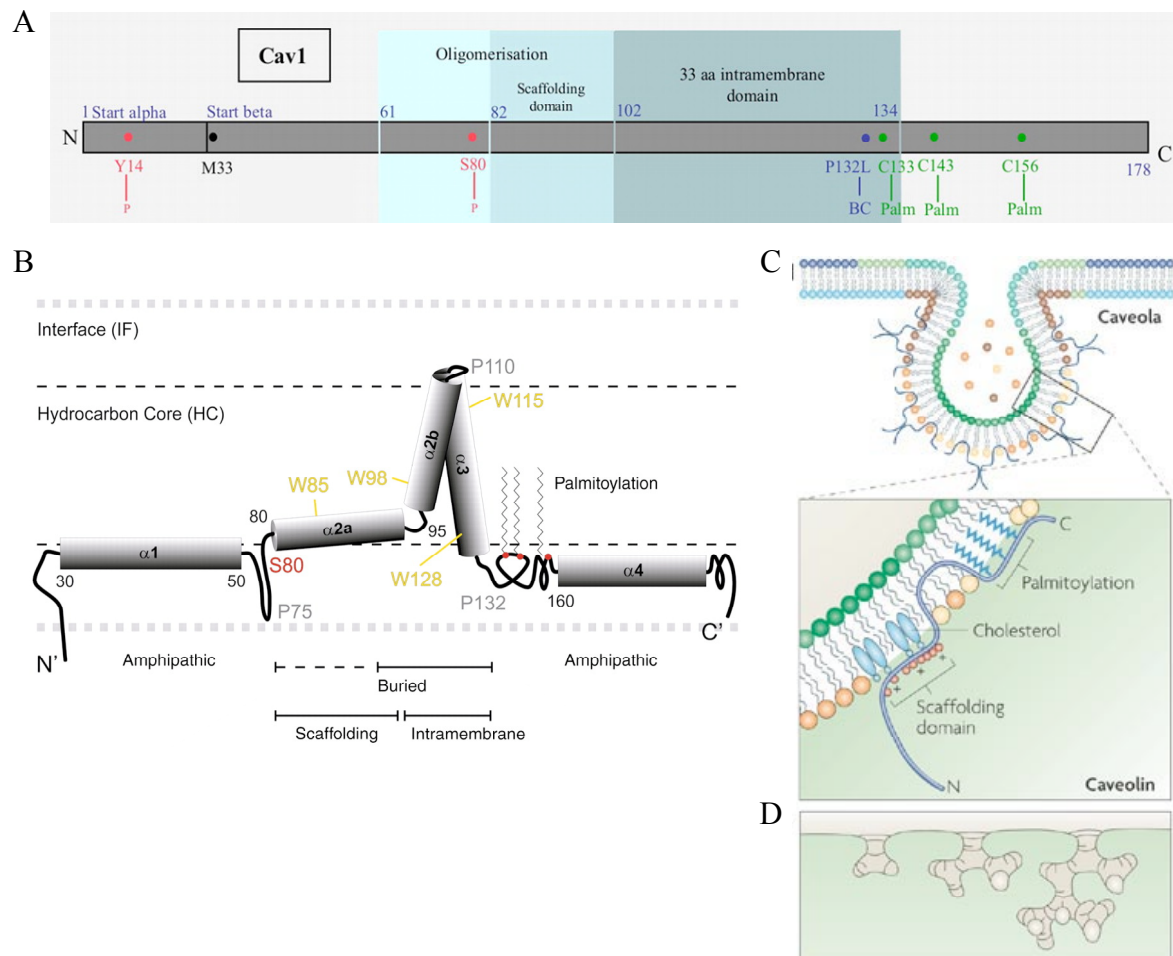


Figure 42 : Schéma des différents domaines de Cav1.

A : Les numéros d'acides aminés sont notés en bleu au dessus de la ligne. Les sites de palmitoylation sont notés en vert, les sites de phosphorylation sont notés en rouge et les codons start pour les isoformes α et β sont notés en noir. Les substitutions d'acides aminés dans la séquence de Cav1 associées à des maladies sont notées en bleu (cancer du cerveau : « BC ») (d'après Parton *et al.*, 2006).

B : Modèle topologique de Cav1 prédit à partir de sa séquence primaire (d'après Parton *et al.*, 2006).

C. Les domaines N-terminal et C-terminal de la cavéoline font face au cytoplasme et un domaine intramembranaire en forme d'épingle à cheveux est inséré dans la bicouche lipidique. Le « scaffolding domain » est un domaine hautement conservé et joue un rôle dans l'interaction avec le cholestérol avec des résidus basiques hydrophobes. Le domaine C-terminal est proche du domaine trans-membranaire est modifié par des groupes palmitoyls qui sont insérés dans la bicouche lipidique. Les structures complexes qui sont formées par des cavéoles interconnectées occupent une large région de la membrane plasmique (d'après Parton *et al.*, 2007).

D. Schéma représentant la formation hypothétique des structures permettant l'invagination de nombreuses cavéoles (d'après Parton *et al.*, 2007).

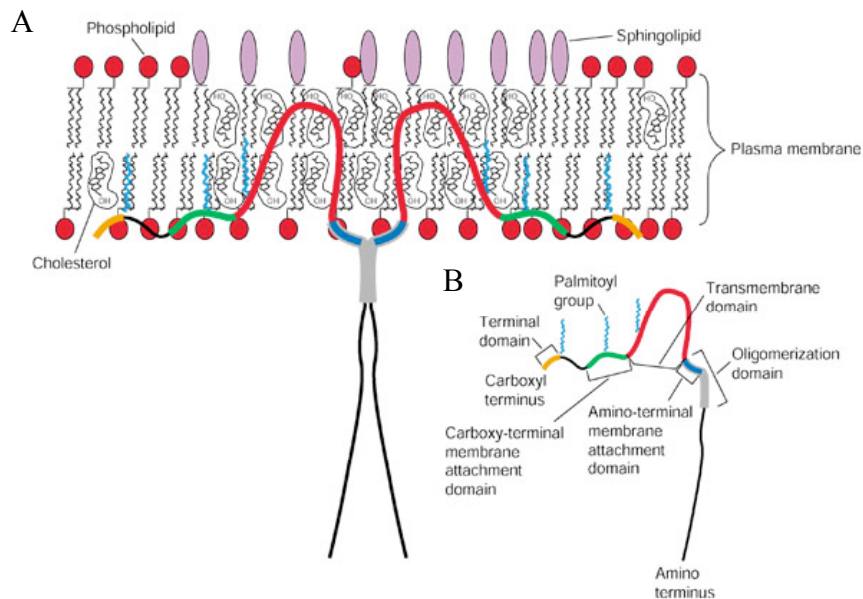


Figure 43: Topologie de Cav1.

A : Topologie de Cav1 à partir de sa structure primaire. Deux monomères de Cav1 forment un dimère. Cette oligomérisation peut aller jusqu'à environ 16 monomères.

B : Les domaines de Cav1. Le domaine N-terminal est également appelé « scaffolding domain » (Williams *et al.*, 2004).

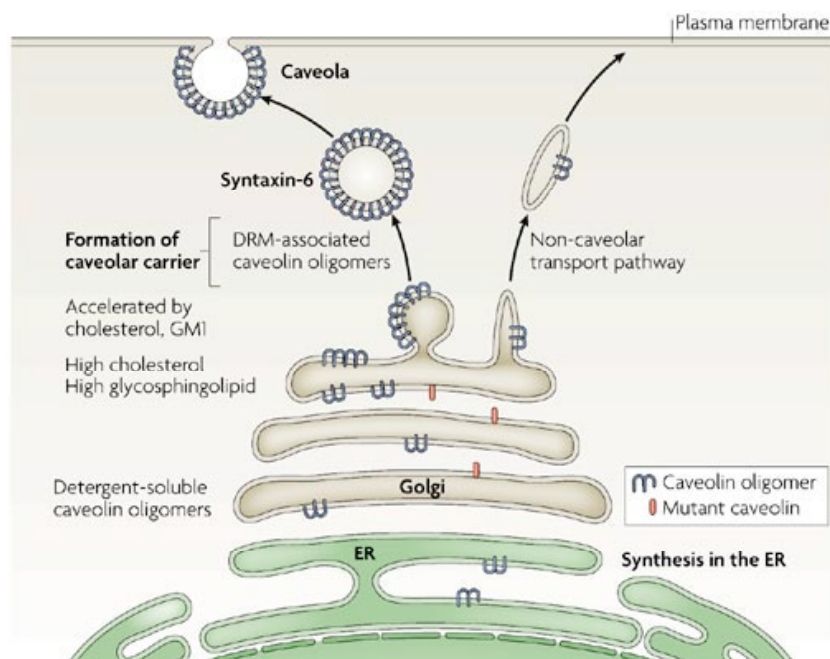


Figure 44 : Biosynthèse de la cavéoline et trafic vers la membrane plasmique. La cavéoline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et est transportée vers le complexe de Golgi sous forme d'oligomères insolubles aux détergents. Lorsque la cavéoline sort du complexe de Golgi, les oligomères s'associent avec des domaines « radeaux lipidiques » enrichis en cholestérol et en glycosphingolipides. Ces complexes fusionnent ensuite avec la membrane plasmique au cours d'un processus qui requiert les protéines SNARE et la syntaxine 6. Des protéines cavéoline mutantes qui sont associées à de nombreuses maladies s'accumulent dans le Golgi et ne sont pas transportées efficacement en membrane plasmique (en rouge sur la figure) (Parton *et al.*, 2007).

structures cavéolaires (Park et al., 2000). Ces structures sont recyclées en membrane plasmique afin d'être réutilisées tout en maintenant une forte association entre les oligomères de cavéolines. Le processus de fusion des cavéoles avec la membrane plasmique est hautement régulé (Pour une revue : (Parton and Simons, 2007)). La composition des cavéoles est probablement hétérogène au sein d'une cellule, et ce, en fonction des signaux externes. De plus, les filaments d'actine peuvent recruter les cavéoles en des sites spécifiques afin d'influencer les signaux cellulaires en réponse à l'adhérence cellulaire ou la migration (Pour une revue : (Stahlhut et al., 2000)).

b. Description de la cavéoline

La famille de la cavéoline comprend la cavéoline 1 α et β , la cavéoline 2 α , β , γ et la cavéoline 3 qui diffèrent au niveau de leur structure moléculaire et de leur distribution au sein des tissus (figure 41) (Park et al., 2000) ; (Pour une revue : (Schwencke et al., 2006)). La cavéoline 1 (Cav1) et la cavéoline 2 (Cav2) sont abondantes dans les cellules non musculaires riches en cavéoles comme les fibroblastes, les adipocytes, etc. La cavéoline 3 (Cav3) est présente essentiellement dans les cellules des muscles squelettiques et dans les cellules musculaires lisses (Park et al., 2000). Les 3 cavéolines présentent une topologie peu commune. Leurs domaines N- et C-terminaux sont localisés dans le cytosol alors que le long domaine central est transmembranaire et présente une structure en épingle à cheveux (Park et al., 2000). Les isoformes Cav1 α et Cav1 β résultent d'un épissage alternatif et diffèrent par leur domaine N-terminal. L'isoforme α contient les résidus 1 à 178 alors que l'isoforme β contient les résidus 32 à 178 (figure 42) (Sargiacomo et al., 1995). L'absence de Cav1 ou Cav3 entraîne la disparition des cavéoles (Park et al., 2000). En contraste, la perte de Cav2 n'a pas d'effet apparent sur la formation des cavéoles *in vivo* (Park et al., 2000). La formation des cavéoles par Cav1 et Cav3 implique leur oligomérisation via leur domaine N-terminal et leur association avec les domaines « lipid-raft » (radeau lipidique) riches en cholestérol (figure 43) (Park et al., 2000) ; (Pour une revue : (Parton et al., 2006)). Alors que Cav1 et Cav2 forment des hétéro-oligomères, Cav3 forme des homo-oligomères (Pour une revue : (Schwencke et al., 2006)). Ces complexes peuvent contenir jusqu'à 16 monomères (Pour une revue : (Head and Insel, 2007)). La palmitoylation dans le domaine C-terminal ne semble pas nécessaire à la localisation de la cavéoline en membrane, mais permet la stabilisation des oligomères de cavéoline (Park et al., 2000; Stan, 2005) ; (Pour une revue : (Parton et al., 2006)). De plus, l'association avec le cholestérol est essentielle pour l'oligomérisation et l'insertion en membrane plasmique (Pour une revue : (Head and Insel, 2007)). Cette protéine peut être phosphorylée au niveau de résidus sérine ou thréonine

par la PKC α ou sur des résidus tyrosine par Src ainsi que par d'autres protéines (Pour une revue : (Stan, 2005)).

c. Trafic et localisation subcellulaire des cavéolines

La cavéoline est synthétisée et oligomérisée dans le réticulum endoplasmique (figure 44) (Park et al., 2000). Elle est ensuite transportée vers le complexe du Golgi (Park et al., 2000). La sortie de la cavéoline de ce compartiment est associée à des changements de propriété de cette protéine suite à l'addition de cholestérol et au masquage de certains de ses épitopes (Park et al., 2000). La cavéoline devient alors résistante aux détergents et est organisée en oligomères de taille plus importante caractéristiques de la protéine observée en membrane (Park et al., 2000). La cavéoline en membrane plasmique est relativement immobile et devient beaucoup plus mobile suite à la déplétion en cholestérol (Park et al., 2000). Les cavéoles sont alignées le long des filaments d'actine dans des cellules musculaires et non-musculaires (Pour une revue : (Stahlhut et al., 2000)). Néanmoins, il semble que seulement une fraction des cavéoles présente une association avec une partie des fibres d'actine. Même si les cavéoles sont immobiles et stabilisées par la cavéoline et le cytosquelette d'actine, cela n'exclut pas que quelques cavéoles soient internalisées (Pour une revue : (Hommelgaard et al., 2005)). La relation entre la cavéoline située en membrane plasmique et les composants du cytosquelette d'actine semble être un processus dynamique contrôlé par des kinases, qui permettent le transport de la cavéoline de la membrane plasmique vers les sites intracellulaires (Pour une revue : (Head and Insel, 2007)). La destruction des microtubules et des microfilaments d'actine élimine les cavéoles et permet la redistribution de la cavéoline.

Bien que Cav1 soit connue pour être localisée en membrane plasmique, elle peut également être présente dans les mitochondries, dans la lumière du réticulum endoplasmique, dans le complexe du Golgi et dans les endosomes de recyclage (Pour une revue : (Quest et al., 2004)) ; (Pour une revue : (Head and Insel, 2007)). Une localisation nucléaire de Cav1 a déjà été décrite pour des cellules endothéliales et des cellules de carcinomes (Sanna et al., 2007). La distribution de Cav1 semble donc être dépendante du type cellulaire étudié (Feng et al., 1999; Gobeil et al., 2003; Quest et al., 2004).

d. Fonctions de la cavéoline

Une des fonctions principales de Cav1 est d'interagir et d'activer ou d'inhiber de nombreuses protéines signal via son domaine d'interaction (Park et al., 2000) ; (Pour une revue : (Schwencke et al., 2006)). Par exemple, cette protéine permet l'activation de la voie PI3K/Akt et

l'inhibition de la voie des ERK (Pour une revue : (Liu et al., 2002)) ; (Cho et al., 2003; Shack et al., 2003; Zhang et al., 2007). Cependant, il a également été montré que Cav1 permet l'activation de ces 2 voies après exposition de kératinocytes aux UV (Wang et al., 2005). Cav1 permet donc soit l'activation soit l'inhibition de voies de signalisation. La localisation subcellulaire de Cav1 pourrait être responsable de l'induction de l'une de ces fonctions opposées. En effet, puisque Cav1 peut oligomériser et interagir avec de nombreuses protéines, elle permet d'organiser la rencontre de molécules signal avec certains récepteurs et des protéines effectrices (Wang et al., 2005). Cependant, si ces protéines associées avec Cav1 sont internalisées au sein des cavéoles, les interactions avec d'autres protéines situées dans le cytosol devient impossible et les signaux cellulaires ne peuvent être induits. De plus, le domaine d'interaction de Cav1 semble être masqué durant la formation des cavéoles. On peut proposer l'hypothèse que cela ce qui limiterait le recrutement d'autres protéines signales proches des cavéoles. Puisque Cav1 peut également être soluble dans le cytosol, elle pourrait également être impliquée dans l'activation de voies de signalisation sans être localisée en cavéoles.

Comme déjà expliqué ci-dessus, Cav1 permet d'ancrer les cavéoles au cytosquelette d'actine (Stahlhut et al., 2000).

Cav1 interagit avec le cholestérol, lie les acides gras et les gouttelettes lipidiques, et est impliquée dans le transport des lipides vers les membranes chez les adipocytes ainsi que chez d'autres types cellulaires (Park et al., 2000). L'abondance de Cav1 facilite l'entrée d'acides gras dans la cellule et augmente le niveau de cholestérol libre ainsi que son exportation (Park et al., 2000). De récentes études démontrent que la cavéoline contribue à la régulation de fonctions cellulaires telles que l'activation de protéines signal impliquées dans l'adhérence cellulaire, l'activation des cellules T, l'activation de voies dépendantes du récepteur à l'EGF en réponse à un stress oxydatif, dans des régions autres que les cavéoles (Pour une revue : (Head and Insel, 2007)).

e. Rôle de Cav1 dans la sénescence répllicative et la sénescence prématurée induite par un stress oxydatif

Chez des FDHs IMR-90 en sénescence répllicative, il a déjà été montré que les protéines ERK1/2 ne sont plus phosphorylées après stimulation avec de l'EGF. Il semble que cette diminution de réponse soit liée à une augmentation de l'abondance protéique de Cav1, à une forte interaction entre Cav1 et le récepteur à l'EGF ainsi qu'à une augmentation du nombre de cavéoles (Park et al., 2000). D'autres études proposent que les protéines ERK sont toujours bien phosphorylées chez des FDHs WI-38 sénescents mais que les protéines ERK s'accumulent dans

le cytosol et ne migrent plus vers le noyau (Tresini et al., 2001). Le phénotype de sénescence répllicative de FDHs isolés à partir de peau de prépuce est partiellement réversible suite à la réduction de l'abondance de Cav1 en utilisant des siRNA dirigés contre les transcrits de cette protéine (Cho et al., 2003). Chez ces mêmes cellules en sénescence répllicative, les changements morphologiques pourraient être régulés par Cav1 et par son interaction directe avec les protéines Rac1 et Cdc42 (Cho et al., 2004).

Une autre étude démontre qu'un stress avec H_2O_2 à concentration sublétalement induit la sénescence prématurée de FDHs par stimulation de la transcription de Cav1. Il semble que cette induction de l'expression de Cav1 soit sous le contrôle de $p38^{MAPK}$ et du facteur de transcription Sp1 (Dasari et al., 2006). Chez des fibroblastes murins immortalisés NIH3T3 traités avec une concentration sublétalement de H_2O_2 , la phosphorylation de Cav1 sur la tyrosine 14 est induite via l'activation des kinases $p38^{MAPK}$ et c-Src (Volonte et al., 2001). Cav1 est également induite chez des fibroblastes NIH3T3 en sénescence prématurée induite par un traitement avec H_2O_2 . Dans ce cas, l'activité SA β -gal, l'activation de p53 et l'induction de $p21^{WAF-1}$ ne sont plus observées lorsque Cav1 est invalidée (Volonte et al., 2002).

V. APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTEOMIQUES

Les études transcriptomiques et protéomiques sont deux types d'approches complémentaires utilisées afin d'appréhender les modifications de l'expression génique d'une population cellulaire donnée. Dans les paragraphes précédants de l'introduction, nous avons brièvement présenté quelques études à grande échelle réalisées dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires qui ont lieu lors de la sénescence répliquative ou lors de la sénescence prématurée. Nous présentons ici de façon synthétique le principe général de différentes techniques utilisées lors d'études transcriptomiques ou protéomiques.

V.1. Approches transcriptomiques

Parmi les techniques mises au point afin d'étudier l'expression génique au niveau transcriptomique, citons par exemple le « differential display RT-PCR », l'hybridation soustractive et les micro-damiers à ADN.

Le « differential display RT-PCR » permet la comparaison de deux ou plusieurs conditions à partir desquelles l'ARN est extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à des amorces poly-T et des amorces aléatoires arbitrairement choisies (Liang and Pardee, 1992). L'utilisation d'oligonucléotides marqués radioactivement permet de détecter les produits PCR séparés sur gel de polyacrylamide et dont l'intensité est détectée par autoradiographie. Malgré les améliorations apportées depuis sa mise au point, l'inconvénient principal de cette technique reste la présence de faux positifs qui rendent nécessaire la vérification des différences d'expression observées, par des méthodes alternatives (Linskens et al., 1995).

L'hybridation soustractive permet de comparer l'abondance des transcrits de deux populations cellulaires déterminées. Les ADNc générés par rétrotranscription à partir des ARNm de la première population cellulaire sont marqués radioactivement et hybridés avec les ARNm de la seconde population. Les gènes correspondant aux ARNm non hybridés, et donc différentiellement exprimés, sont identifiés. Cette technique nécessite néanmoins de grandes quantités d'ARN de départ, ce qui n'est pas toujours évident à obtenir à partir de systèmes *in vitro* (Gonos et al., 1998).

La technique des micro-damiers à ADN se base sur l'hybridation d'ARN ou d'ADN issus d'une population cellulaire déterminée sur des oligonucléotides complémentaires, eux-mêmes greffés sur un support solide. Elle a été mise au point dans le but de miniaturiser le principe du « reverse blot ». Celui-ci permet l'hybridation d'une séquence d'ADN sur une banque d'ADNc greffés sur

un filtre en nylon (Lander, 1999) ou sur du verre. L'avantage de cette technique est que l'on peut étudier simultanément les variations d'abondance de nombreux transcrits.

V.2. Approches protéomiques

Le protéome se définit en théorie par l'entière des protéines exprimées par un génome à un moment donné et dans des conditions données. Selon une définition large, l'analyse protéomique peut consister à étudier le profil d'abondance de ces protéines, mais également leur niveau de dégradation ou encore leurs modifications post-traductionnelles. Aucune technique actuelle ne donne accès à l'ensemble de ces données concernant toutes les protéines présentes dans un système biologique à un moment donné. Néanmoins, les avancées techniques réalisées dans ce domaine depuis les premières études protéomiques permettent d'élargir la quantité de données obtenues grâce à une seule étude.

Plusieurs étapes constituent une analyse protéomique : la préparation des échantillons protéiques, leur séparation, leur analyse par spectrométrie de masse et enfin l'identification des protéines par comparaison des informations obtenues avec celles qui sont disponibles dans les banques de données.

Parmi les techniques disponibles pour la séparation des protéines, il existe des approches dépendantes ou indépendantes des gels. Dans les paragraphes suivants, nous décrivons brièvement les techniques de séparation de protéines les plus couramment utilisées.

V.2.A. Les gels à deux dimensions

a. Généralités

L'électrophorèse en gels de polyacrylamide à deux dimensions (2DGE) permet la séparation des protéines selon leur point isoélectrique (première dimension : IEF « IsoElectric Focusing ») puis selon leur poids moléculaire (seconde dimension : électrophorèse SDS-PAGE (« sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis »)). Afin de visualiser les protéines, plusieurs types de colorations peuvent être utilisées. Selon la technique de marquage utilisée, cette étape est réalisée avant ou après leur séparation grâce aux 2DGE. La coloration des protéines au bleu de Coomassie, à l'argent, au ruthénium, etc. a lieu après leur séparation alors que leur marquage métabolique ou aux cyanines est réalisé avant cette étape de séparation. Le marquage métabolique est réalisé par utilisation d'isotopes radioactifs (par exemple la méthionine [^{35}S]) placés dans le milieu d'une culture cellulaire durant plusieurs heures afin d'être incorporés au sein des nouvelles protéines traduites. Cette technique de marquage permet

donc de visualiser la néosynthèse des protéines qui a lieu durant un laps de temps déterminé alors que les autres techniques de coloration permettent de visualiser les variations d'abondance protéique d'un système biologique à un moment précis.

Les gels sont ensuite analysés afin de déterminer les spots correspondant aux protéines qui présentent des variations d'abondance entre les différentes conditions étudiées. Les spots correspondant aux protéines d'intérêt sont ensuite prélevés du gel et ces protéines sont identifiées par utilisation de la spectrométrie de masse (MS) ou de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et par interrogation des banques de données.

La technique d'analyse par 2DGE représente une technique d'analyse de protéines très puissante mais présente également certaines limites.

b. Limites des gels à 2 dimensions

La résolution insuffisante des gels conduit parfois au mélange de plusieurs protéines au sein d'un même spot. Dans ce cas, la gamme de pH utilisée pour la séparation des protéines selon la première dimension peut être restreinte afin d'augmenter cette résolution.

La technique des 2DGE rend également difficile l'analyse de certaines classes de protéines. Premièrement, les protéines faiblement abondantes sont peu visibles sur les gels. Ainsi, les protéines fortement exprimées, comme les protéines du cytosquelette ($\sim 10^8$ molécules/cellules) sont bien visibles alors que les facteurs de transcription faiblement exprimés ($\sim 10^2$ molécules/cellules) sont peu détectés sur les 2DGE. Afin de limiter ces problèmes, il est avantageux de fractionner les échantillons protéiques avant leur séparation sur 2DGE. Il est par exemple possible de réaliser des études en subprotéomique afin d'extraire les protéines d'une fraction enrichie et hautement purifiée en un organe d'intérêt, ou même d'étudier un type de modification post-traductionnelle comme les phosphorylations. Ceci présente l'avantage d'enrichir les échantillons protéiques avant leur séparation sur 2DGE (Pour une revue : (Rabilloud, 2002)).

Deuxièmement, des protéines extrêmement acides ou basiques ne sont pas facilement séparées et donc visualisées sur les 2DGE. Il est par exemple connu que les protéines membranaires sont très hydrophobes et donc entrent difficilement dans le gel de première dimension. Des détergents spécifiques améliorent la solubilisation de ces protéines. Néanmoins, ces gels de première dimension ne permettent de couvrir qu'une gamme de pH située entre 3 et 11 (Pour une revue : (Rabilloud, 2002)).

Troisièmement, les protéines de taille extrême, très petites ou très grosses ne sont pas toujours visibles sur les 2DGE. Les protéines de poids moléculaire supérieur à 200 KDa ou inférieures à

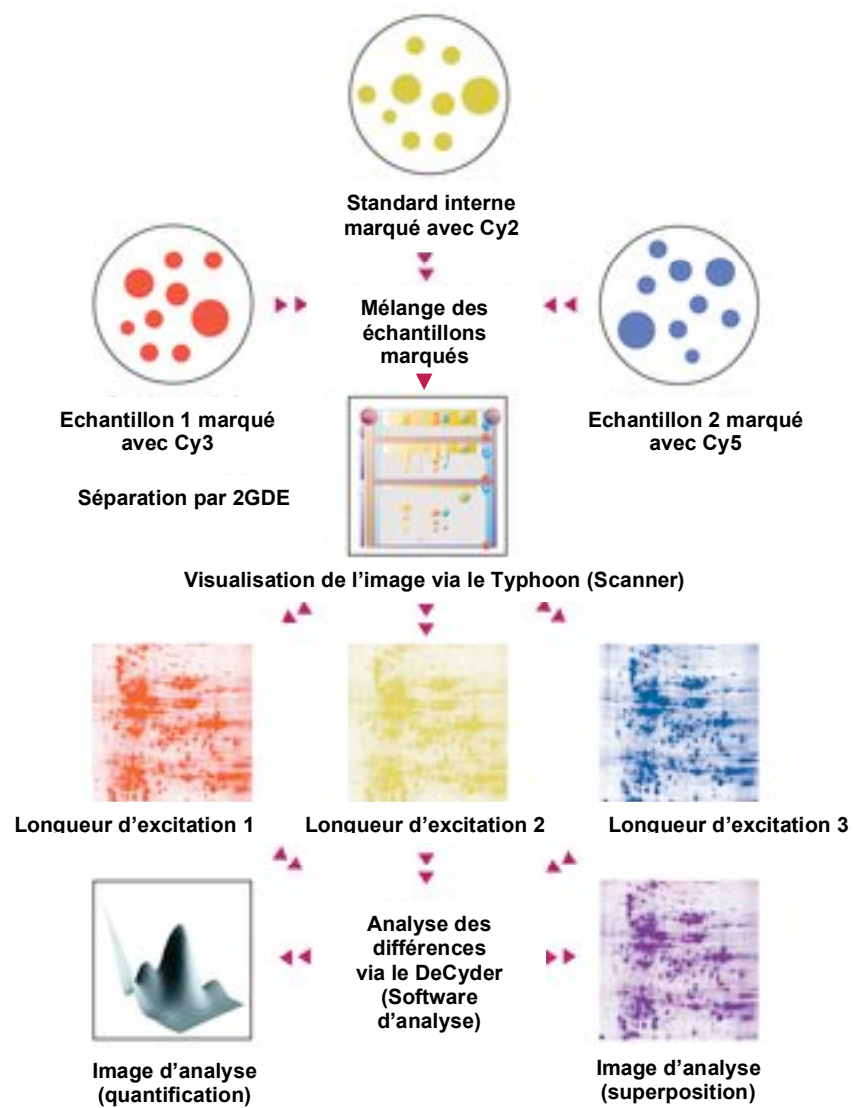


Figure 45 : Principe du 2D-DIGE (D'après Amersham Biosciences ; GE Healthcare).

15 KDa ne sont généralement pas capturées dans le gel de seconde dimension (Pour une revue : (Rabilloud, 2002)).

Des variabilités existent entre les gels à comparer, ce qui rend difficile de déterminer si les variations observées sont d'ordre biologique ou technique. Afin de résoudre ce problème, la technique des 2D-DIGE (« 2D-Differential In-Gel Electrophoresis ») a été développée (Pour une revue : (Graves and Haystead, 2002)).

c. La technique 2D-DIGE

Pour utiliser cette technique, les protéines issues des différentes conditions sont marquées avec des cyanines fluorescentes différentes avant leur séparation sur 2DGE (Figure 45). Leur migration est réalisée sur un seul gel, de même qu'un standard interne marqué, lui aussi, avec des cyanines différentes. Cette technique présente de nombreux avantages. La migration des échantillons et d'un standard interne sur un même gel permet d'éliminer les variations de gel à gel. Le marquage protéique aux cyanines permet de visualiser à la fois des protéines faiblement et fortement abondantes. Les programmes d'analyse automatisés permettent de déterminer très rapidement des variations d'abondance ayant un poids statistique important. Suite à ces analyses, les spots d'intérêt sont excisés et les protéines correspondantes sont identifiées par analyse en spectrométrie de masse.

V.2.B. La spectrométrie de masse

Après avoir séparé les protéines par 2DGE, la digestion protéique par une protéase permet de générer un mélange complexe des peptides. Ce mélange est analysé par la spectrométrie de masse. Quel que soit l'appareil utilisé, la spectrométrie de masse est toujours composée de trois éléments. En premier lieu, une source permet d'ioniser les peptides et de les faire passer en phase gazeuse. Ensuite, un analyseur permet de séparer les peptides ionisés en fonction de leur rapport masse/charge. Ces peptides arrivent alors au niveau d'un détecteur. Différents systèmes de spectrométrie de masse existent selon leurs techniques d'ionisation et d'analyse.

En ce qui concerne l'ionisation des peptides, il existe la technique de « matrix-assisted laser desorption and ionization » (MALDI) ou celle de « l'electrospray » (ESI). Le MALDI consiste à co-cristalliser les peptides mélangés à une matrice, le tout déposé sur une cible. Un laser dirigé vers cette cible permet de désorber le mélange peptides/matrice qui est alors ionisé. « L'electrospray » permet de vaporiser la solution contenant les peptides sous forme de micro-gouttelettes chargées afin de les faire passer de la phase liquide à un état gazeux.

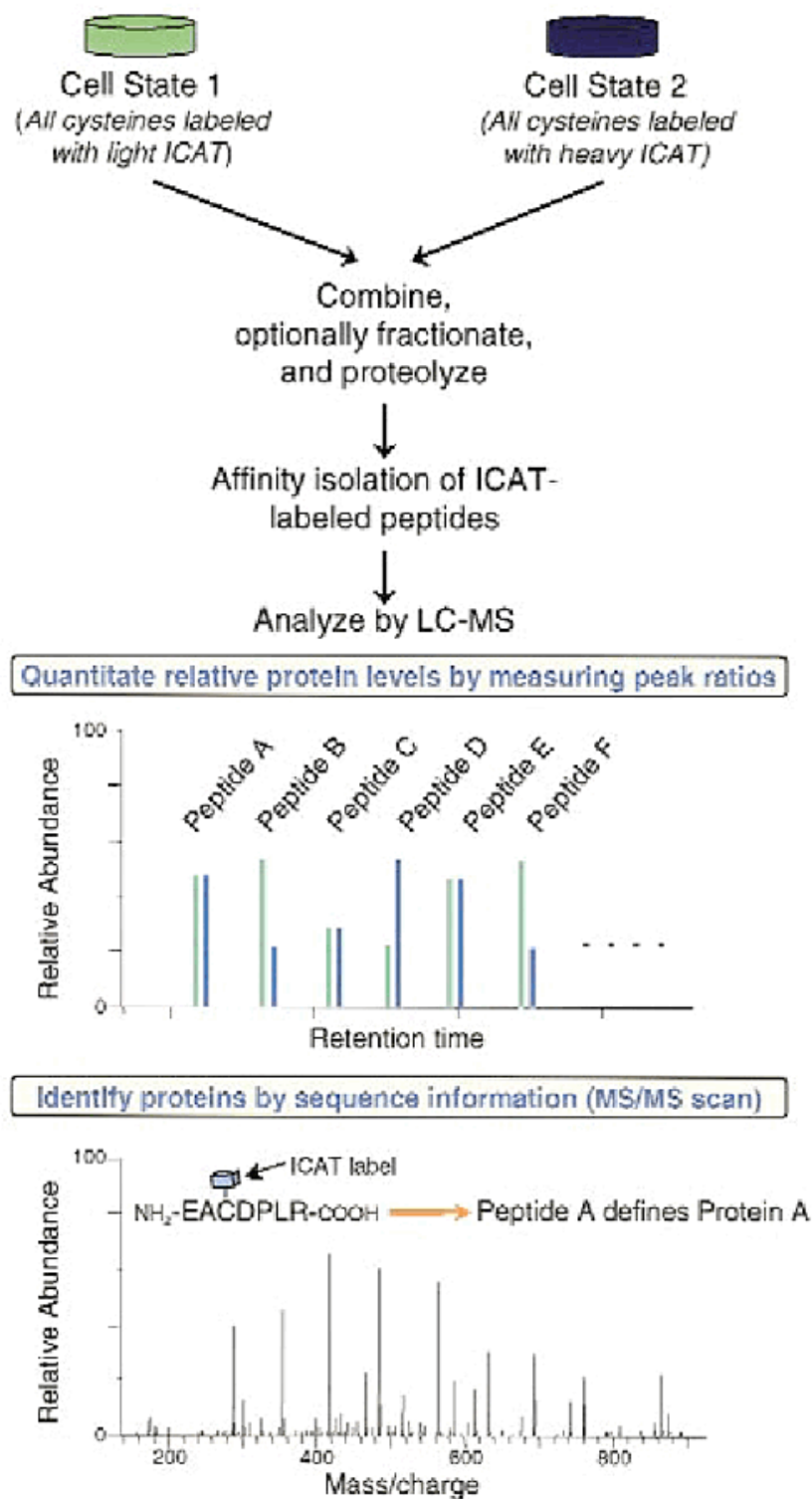


Figure 46 : Principe de la technique ICAT pour quantifier l'expression protéique différentielle (Gygi *et al.*, 1999).

L'analyseur des peptides ionisés peut être un TOF (« time of flight ») ou un « quadrupole ». Lorsque l'on veut réaliser de la MS, l'échantillon chargé est accéléré grâce à un champ électrique et vole dans un tube placé sous vide (TOF). Ce temps de vol dépend du rapport masse/charge du peptide ionisé. Le détecteur permet alors d'établir une carte d'empreinte peptidique pour chaque peptide. Un ensemble de cartes peptidiques est donc obtenu pour une protéine donnée, ce qui augmente la probabilité d'identification de la protéine. Lorsque ces informations ne suffisent pas à identifier une protéine, la MS/MS est utilisée. Elle combine l'utilisation d'un quadrupole (quatre tiges d'acier parallèles 2 à 2 et pour lesquelles un potentiel électrique est appliqué alternativement aux paires opposées) pour sélectionner un peptide précurseur sur base de son rapport masse/charge avec l'utilisation d'une cellule de collision contenant un gaz inerte afin de fragmenter cet ion peptidique, et d'un tube de vol permettant de séparer les petits peptides générés afin d'obtenir la séquence du peptide précurseur (Schiller et al., 2004a) (Pour une revue : (Graves and Haystead, 2002)).

Ainsi, bien que l'analyse des protéines par 2DGE représente une technique très utilisée et très avantageuse, les limites décrites pour les 2DGE, le temps nécessaire à la manipulation, le manque d'automatisation et les quantités importantes de protéines à charger sur un gel d'électrophorèse ont poussé au développement d'autres approches permettant la séparation des protéines avant leur identification par utilisation de la spectrométrie de masse (Gygi et al., 1999).

V.2.C. Les techniques alternatives aux gels à deux dimensions

Les protéines extraites à partir d'un échantillon et digérées par une protéase constituent un mélange complexe de peptides. Il est donc important de réduire cette complexité avant l'analyse en spectrométrie de masse. Il est possible soit de séparer les peptides avant leur analyse par spectrométrie de masse (par exemple, par la technique MudPIT décrite ci-dessous) soit d'isoler les peptides représentatifs du mélange (par exemple, par les techniques ICAT ou iTRAQ décrites ci-dessous). Ces techniques permettent d'analyser de très faibles quantités de protéines.

Contrairement à ce type d'approche, la technique SILAC (décrite plus bas dans le texte) permet le marquage des protéines aux sein des cellules avant leur digestion et leur analyse par spectrométrie de masse.

a. ICAT

La technique ICAT (« isotope-coded affinity tags ») permet de quantifier l'abondance protéique différentielle issue, par exemple, de deux populations cellulaires différentes (figure

46). Le réactif ICAT est constitué d'une biotine, permettant l'isolement par chromatographie d'affinité des peptides marqués par ICAT, d'une charnière pouvant contenir des variants isotopiques stables, et d'un groupe iodoacétamide réactif possédant une spécificité de liaison pour les groupements sulfhydryl libres des résidus cystéine. Ce réactif existe sous une forme lourde (contenant 8 deutérium) ou une forme légère (ne contenant pas de deutérium). Les protéines extraites à partir de deux cultures cellulaires différentes sont marquées respectivement avec l'un de ces deux variants isotopiques. Après mélange des deux échantillons et digestion par une protéase, les peptides marqués sont isolés grâce à la biotine. Ces peptides sont séparés par chromatographie liquide microcapillaire (LC-MS, liquid chromatography/mass spectrometry) et les spectres de masses générés sont analysés. Une différence de 8 daltons est observée entre les pics générés par les peptides identiques marqués à l'hydrogène ou au deutérium. Le ratio obtenu entre ces pics pairés permet de quantifier les différences d'abondance de la protéine correspondante entre les deux échantillons (Gygi et al., 1999). Néanmoins, cette technique présente également quelques limitations. Par exemple, les protéines présentant peu ou pas de résidu(s) cystéine tout comme certaines modifications post-traductionnelles ne sont pas détectées. De plus, les peptides identiques marqués avec l'isotope lourd ou léger ne sont pas toujours élués en même temps, ce qui complexifie l'analyse des spectres de masse (Wu et al., 2006). Il a également été observé que la molécule de marquage de poids moléculaire important interférait avec la digestion des protéines par la trypsine. Suite à ces observations, des méthodes dérivées de ICAT ont été mises au point et permettent d'améliorer la simplicité, l'efficacité et la sensibilité de cette technique. Par exemple, le deutérium de la molécule a été remplacé par du ^{13}C et le groupe de biotine a été rendu clivable en présence d'acide de manière à pouvoir l'éliminer après avoir isolé les peptides marqués (Zhou et al., 2002).

b. iTRAQ

La technique iTRAQ (« isobaric tagging for relative and absolute quantification ») est basée sur le marquage de lysine ou de tyrosine du côté N-terminal des protéines préalablement digérées. La molécule utilisée est constituée d'un groupement réactif spécifique des groupements amine et d'un « tag » de masse définie (constitué lui-même d'un groupement rapporteur dont la masse varie de 113 à 121). Les différentes conditions à comparer sont marquées avec des « tags » différents (selon l'ion isotopique rapporteur utilisé) avant que les échantillons protéiques ne soient mélangés et fractionnés sur une colonne échangeuse de cations puis analysés en utilisant une LC-MS/MS (« liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry »). Puisqu'il existe 8 tags différents, la comparaison d'abondance protéique peut être réalisée pour 8

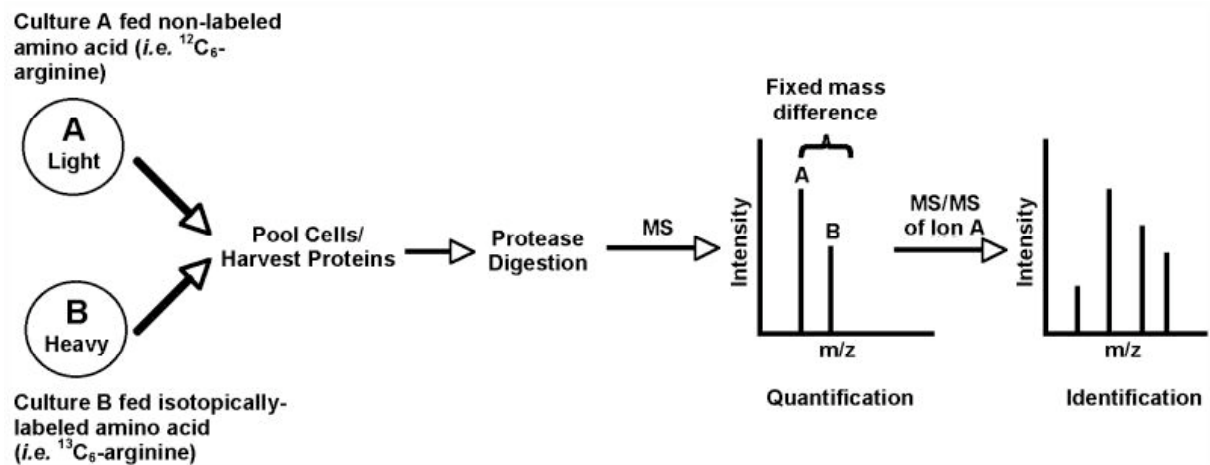


Figure 47: Principe de la technique SILAC pour quantifier l'expression protéique différentielle (Gafken et al., 2006).

échantillons différents. Lors de l'analyse en MS, les peptides marqués avec les différents tags sont impossibles à distinguer puisque ces tags ne présentent pas de différence de masse. Lors de la fragmentation par MS/MS, des « ions signature » sont produits avec un rapport masse/charge entre 113 et 121, ce qui fournit des informations quantitatives (Wiese et al., 2007; Wu et al., 2006).

c. MudPIT

La technique MudPIT (« multidimensional protein identification technology ») constitue un système de séparation des protéines selon deux dimensions indépendantes. Deux chromatographies liquides consécutives correspondent en fait à une colonne échangeuse de cations et une colonne en phase inverse couplées directement au nano-électrospray d'un spectromètre de masse de type MS/MS (Pour une revue : (Rabilloud, 2002)). Cette élution automatisée des peptides selon un gradient à travers les différents dispositifs permet l'identification de protéines hydrophobes, de faible concentration, de pH ou de poids moléculaires extrêmes (Washburn et al., 2001). Néanmoins, cette technique quantitative d'analyse permet uniquement de détecter des absences et des présences de protéines. Elle ne convient donc pas en tant que technique quantitative comparative (Pour une revue : (Rabilloud, 2002)).

d. SILAC

La technique SILAC (« stable labeling by amino acids in cell culture ») est basée sur le marquage des protéines de la culture cellulaire avec des acides aminés contenant des isotopes stables non radioactifs (comme le ^{13}C ou le ^{15}N) (figure 47). Une des deux cultures étudiée est donc placée en présence de milieu contenant l'isotope lourd. Les différents types cellulaires utilisés jusqu'à présent pour ce type d'étude ne présentent aucune altération au niveau de leur prolifération ou de leur morphologie. Le marquage de protéines avec cet isotope est réalisé pendant environ 5 doublements de population en culture. Après la culture cellulaire, les deux échantillons sont mélangés et les protéines sont extraites. Le mélange protéique est digéré par une protéase afin de générer un mélange de peptides à analyser en spectrométrie de masse. Chaque peptide est présent sous deux formes qui présentent les mêmes propriétés chimiques mais une masse différente. Les différences d'intensité du pic permettent d'obtenir une quantification relative entre deux échantillons d'intérêt (Pour une revue : (Gafken and Lampe, 2006)).

Ces différentes techniques présentent chacune des avantages et des inconvénients. En fonction des informations recherchées, il est donc important de choisir la méthode la plus adaptée.

Actuellement, parmi les techniques les plus utilisées, les approches 2D-DIGE, ICAT et iTRAQ permettent d'obtenir des résultats quantitatifs, avec un nombre de faux positifs raisonnable. Alors que la quantification est parfois compromise par le 2D-DIGE, la méthode iTRAQ est susceptible de générer des erreurs lors de l'isolement de l'ion précurseur. Au niveau de la sensibilité, il semble que la technique iTRAQ soit plus sensible que la méthode ICAT ou l'analyse par 2D-DIGE. Néanmoins, l'analyse par 2DGE permet dans un premier temps d'obtenir une vue d'ensemble des profils d'abondance protéique ainsi que des modifications post-traductionnelles. Ces différentes méthodes sont donc complémentaires et les informations obtenues par ces différentes techniques peuvent fournir un meilleur profil protéique du système biologique étudié (Wu et al., 2006).

V.3. Comparaison des approches transcriptomiques et protéomiques

Face aux différentes techniques d'analyse transcriptomique et protéomique existantes, le chercheur doit effectuer un choix en fonction des avantages et inconvénients de chacune, mais également en fonction de l'objet de l'étude et des caractéristiques du modèle étudié. De manière générale, il est connu que les variations d'abondance des transcrits et des protéines correspondantes ne sont pas toujours corrélées. En effet, de nombreuses étapes constituent des points de régulation positive ou négative entre les transcrits et les protéines correspondantes. La protéine peut être transformée en produit fini par un processus de protéolyse puis subir des modifications chimiques comme des modifications post-traductionnelles. À ce stade, la protéine peut être dégradée.

En comparaison avec l'analyse transcriptomique, l'analyse protéomique fournit des informations plus précises à propos des systèmes biologiques et des voies impliquées puisque l'étude se focalise sur les molécules biologiques effectrices (Gygi et al., 1999). Il est possible d'étudier l'expression des protéines, leur abondance, leur localisation, leur homologie de structure, leur régulation, leur activité enzymatique (dans le cas des enzymes), le phénotype qui en découle, etc. Il est également possible d'étudier les interactions protéine-protéine qui ont lieu dans des conditions données. Des comparaisons entre études protéomiques et transcriptomiques ont été réalisées. Par utilisation de la technique SILAC, une étude récente a étudié le profil d'abondance protéique de cellules souches embryonnaires murines et a permis d'identifier 5.111 protéines,

dont des protéines membranaires, cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales. Les auteurs ont ensuite étudié la corrélation entre les variations d'abondance protéiques mises en évidence par leur étude et les variations d'abondance des transcrits mis en évidence par d'autres chercheurs ayant utilisé la technique des damiers à ARNm. Ils ont observé une corrélation modérée entre ces deux types d'études. En effet, parmi les 5490 gènes correspondant aux transcrits analysés et les 4948 gènes correspondant aux protéines analysées, les auteurs montrent un recouvrement de 3322 gènes. Ceci appuie donc le fait que l'abondance protéique n'est pas toujours corrélée à l'abondance de l'ARNm correspondant. Ces auteurs suggèrent aussi que ce manque de corrélation est essentiellement lié aux modifications post-traductionnelles des protéines (Graumann et al., 2007).

En conclusion, il est logique de penser que les approches protéomiques et transcriptomiques sont des approches complémentaires et permettent de mieux comprendre les mécanismes ayant lieu dans un système biologique donné et dans des conditions données.

Au cours de notre travail, nous avons choisi d'utiliser une approche protéomique (gels à deux dimensions) afin d'identifier des protéines impliquées dans l'établissement de la sénescence prématurée des FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 . Le but du travail et les résultats obtenus sont présentés après l'introduction. Néanmoins, nous présentons brièvement les protéines que nous avons identifiées et choisi d'étudier durant notre travail.

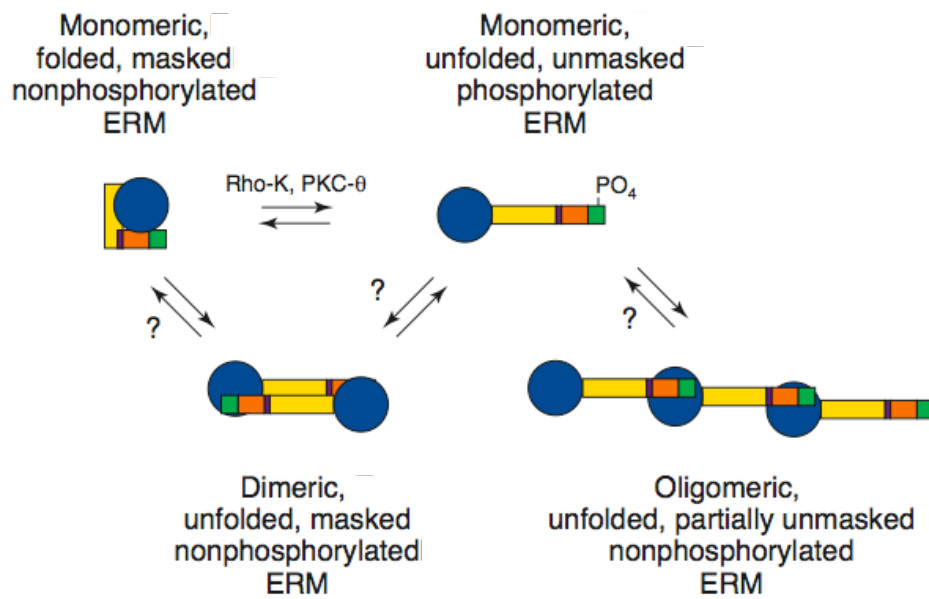


Figure 48 : Conformation possible des protéines ERM (ezrine, radixine, moesine) résultant de l'association entre le domaine N- et C-terminal. La conformation de ces protéines peut être monomérique repliée, monomérique non repliée ou peut générer des structures dimériques ou oligomériques. L'activation des ERM peut résulter de la phosphorylation au niveau du domaine C-terminal de la protéine. Les dimères et oligomères représentent les structures des ERM associées en membrane plasmique (Mangeat *et al.* 1999).

VI. PRESENTATION DES PROTEINES IDENTIFIEES LORS DES ETUDES PROTEOMIQUES REALISEES AU COURS DE CE TRAVAIL

VI.1. Ezrine

La forme active de l'eitrine est impliquée dans son interaction avec la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine. Ceci lui permet donc de jouer un rôle dans le couplage de la signalisation avec la maintenance de l'architecture du cytosquelette d'actine et sa réponse dynamique aux stimuli externes. L'eitrine est d'ailleurs concentrée au niveau de structures riches en actine comme les filipodes, structures régulées essentiellement par Cdc42 (Louvet-Vallee, 2000; Ridley, 2001). L'eitrine est présente également dans le cytosol sous forme « dormante », ce qui résulte de l'interaction intramoléculaire entre son domaine N-terminal (ou « N-ERM-associated domain ») et C-terminal (ou « C-ERM-associated-domain ») (figure 48). Cette conformation masque les sites de liaison pour les partenaires cytoplasmiques et membranaires. Les signaux qui activent l'eitrine entraînent donc un changement de conformation, exposant ainsi ces domaines de liaison (Pour une revue : (Mangeat et al., 1999) ; (Louvet-Vallee, 2000)). L'échange entre le « pool » d'eitrine membranaire ou cytoplasmique joue un rôle crucial. En effet, il contrôle non seulement la quantité relative de molécules d'eitrine sous forme active près de la membrane mais également la quantité relative de temps passé par chaque molécule à la membrane ainsi que le turnover de cette protéine (Coscoy et al., 2002).

VI.2. HSP27

La famille des HSP comprend de nombreux membres qui diffèrent selon leur réponse face aux signaux, leur localisation subcellulaire et leur fonction. Le signal responsable de l'induction des protéines HSP est l'accumulation de protéines dénaturées (Fonager et al., 2002).

HSP27 est une chaperonne indépendante de l'ATP qui est activée et/ou phosphorylée en réponse à des stress osmotiques, oxydatifs, thermiques, ou suite à une exposition aux UV. HSP27 forme des agrégats de 100 à 800 KDa avec les protéines oxydées ou mal repliées, et permet leur dégradation par le protéasome 20S. HSP27 bloque l'accumulation de lipofuscine extrêmement délétère pour la cellule (Arrigo et al., 2005). HSP27 permet également la dégradation de protéines ubiquitinylées comme I κ -B α par le protéasome 26S (Parcellier et al., 2003). Cette protéine phosphorylée module également la polymérisation de l'actine et représente donc la première ligne de défense contre les stress non létaux. Un modèle est proposé en ce qui

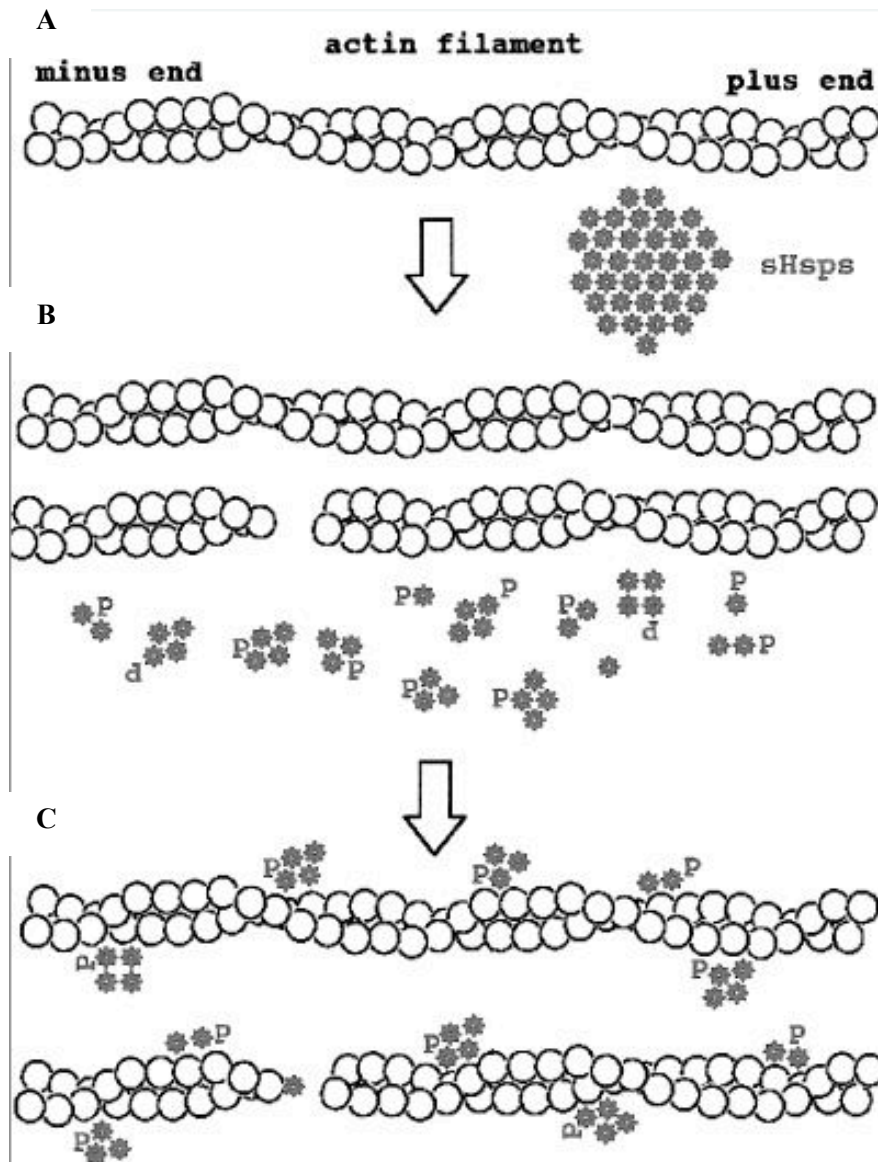


Figure 49 : Modèle de protection des microfilaments d'actine par les HSPs.

A : Chez les cellules non-stressées, les HSPs forment des agrégats de monomères non-phosphorylés.

B : Les réponses rapides suite à un stress sont la phosphorylation des HSPs et la disparition des larges agrégats, après dans quelques cas une hyperoligomérisation transitoire, pour mener à la désorganisation du cytosquelette d'actine.

C : Les HSPs phosphorylées s'organisent en petits oligomères pouvant interagir directement ou indirectement avec l'actine fibrillaire. Ceci permet la protection des filaments d'actine contre les cassures par les protéines à activité « severing » et promeut sa réorganisation. Les monomères non-phosphorylés peuvent former une coiffe pour l'extrémité « plus » des filaments d'actine et participent à la régulation de l'assemblage des microfilaments (Mounier *et al.* 2002).

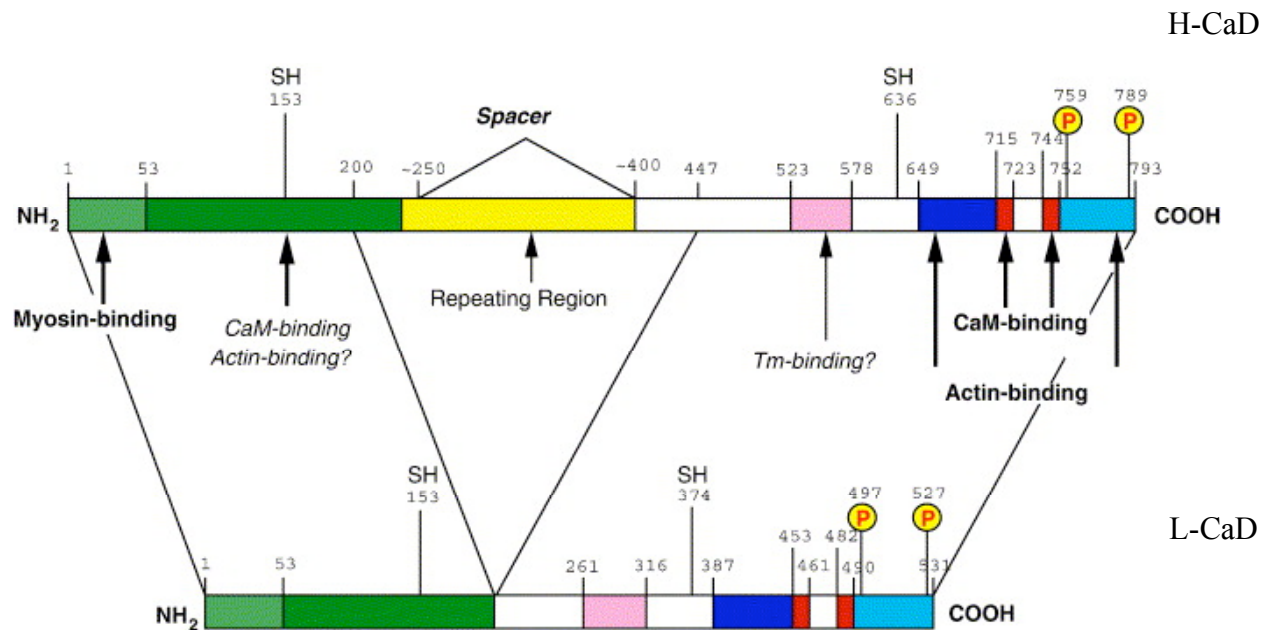


Figure 50 : Domaine de structure des deux isoformes de la caldesmone. L'isoforme lourde (H-CaD) est présente dans les cellules musculaires alors que l'isoforme légère (L-CaD) est présente dans les cellules non-musculaires comme les fibroblastes. Ces deux isoformes sont issues d'un même gène grâce au splicing alternatif. Les domaines fonctionnels majeurs sont conservés dans les deux isoformes. La seule différence est la région centrale, uniquement présente chez l'isoforme lourde (Kordowska *et al.*, 2006).

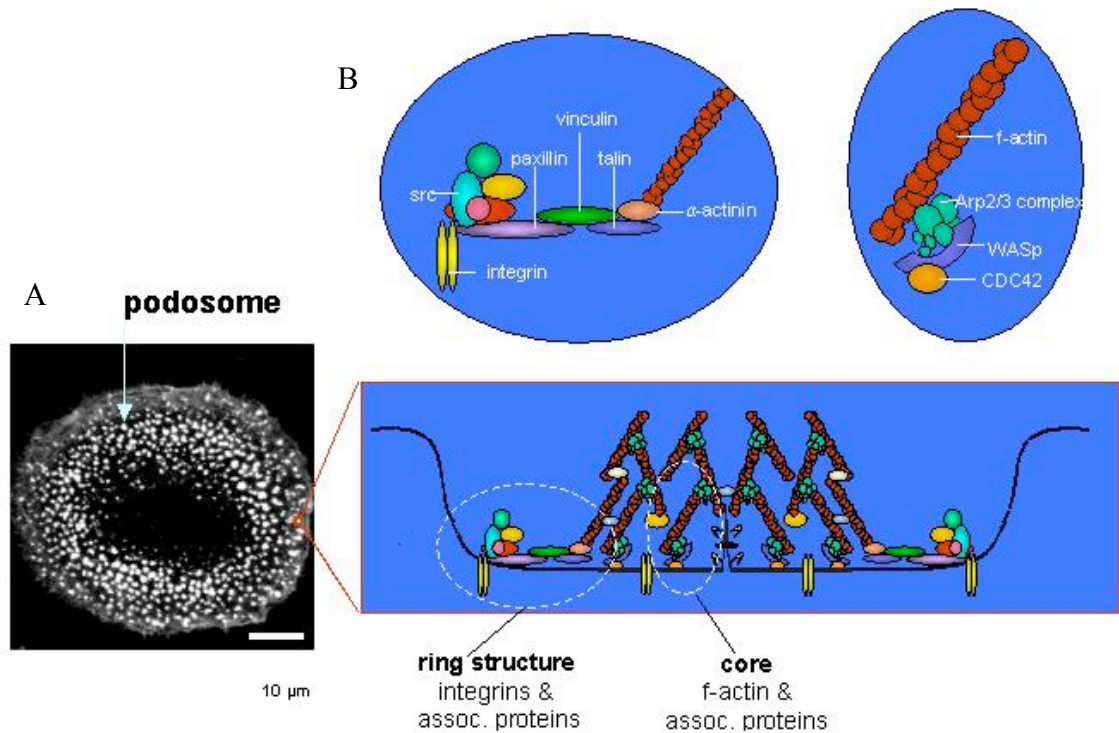


Figure 51 : Modèle de podosome chez des macrophages humains.

A : Micrographie de un macrophage obtenue en microscopie confocale après marquage de l'actine-F. Chaque point lumineux correspond à un seul podosome.

B: Représentation schématique d'une coupe perpendiculaire d'un podosome. Les intégrines induisent la liaison des protéines ERM alors que la paxilline permet l'assemblage d'un complexe contenant Src. Ce complexe est lié à l'actine-F via la vinculine, la taline et l' α -actinine. Les filaments d'actine sont reliés à la membrane plasmique par le complexe comprenant Arp2/3, Cdc42 et WASP/N-WASP (Linder et Aepfelbacher, 2003).

concerne les fonctions de HSP27 (figure 49). En conditions normales, HSP27 formerait de larges agrégats de monomères non phosphorylés. Suite à un stress, la phosphorylation de HSP27 induit la formation d'oligomères de plus petite taille constitués des deux isoformes. Ces oligomères protègent les filaments d'actine de leur disruption en bloquant les protéines à activité « severing ». Cette activité semble bien dissociée de leur activité chaperonne bien connue (Pour une revue : (Mounier and Arrigo, 2002)).

HSP27 monomérique et non-phosphorylée coiffe l'extrémité « plus » des filaments d'actine, bloquant l'addition de monomères d'actine et inhibant donc la croissance des filaments (Paul et al., 2002).

VI.3. Caldesmone

La caldesmone (CaD) est une protéine codée par un seul gène qui génère deux isoformes majeures grâce à l'épissage alternatif : l'isoforme lourde se retrouve dans les muscles lisses (ou H-caldesmone, H-CaD), et l'isoforme légère est située dans les cellules non-musculaires (ou L-caldesmone, L-CaD) (figure 50). Ces isoformes possèdent des domaines N- et C-terminaux identiques mais qui diffèrent par la présence ou non d'un domaine central de 150 acides aminés (Hayashi et al., 1992; Zheng et al., 2004). CaD lie l'actine et la myosine respectivement grâce à son domaine C-terminal et N-terminal (Foster et al., 2004). Les deux isoformes possèdent donc des fonctions similaires *in vitro* et sont distribuées dans les fibres de stress et les renflements membranaires (Hai and Gu, 2006; Helfman et al., 1999).

L-CaD est capable d'inhiber l'activité ATPase de l'actomyosine ainsi que le complexe Arp2/3, responsable de nouveaux branchements au niveau des filaments d'actine (Goncharova et al., 2001; Gu et al., 2007). Cette fonction est inhibée par la calmoduline, en présence de Ca^{++} (Kordowska et al., 2006; Li et al., 2004). CaD et la tropomyosine permettent également de stabiliser les filaments d'actine contre l'activité « severing » de la gelsoline en diminuant son affinité de liaison (Gu et al., 2007; Hai and Gu, 2006; Ishikawa et al., 1998). La gelsoline et le complexe Arp2/3 sont cependant essentiels à la formation de podosomes. Ces structures dynamiques observées dans de nombreux types cellulaires sont caractérisées par une structure centrale de cytosquelette riche en actine-F (actine fibrillaire) associée à d'autres protéines, entourée d'un anneau de vinculine et de taline (figure 51) (Pour une revue : (Linder and Aepfelbacher, 2003)) ; (Eves et al., 2006; Hai and Gu, 2006; Spinardi and Marchisio, 2006). Les podosomes permettent la libération de métalloprotéinases pour le remodelage de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire (Gu et al., 2007).

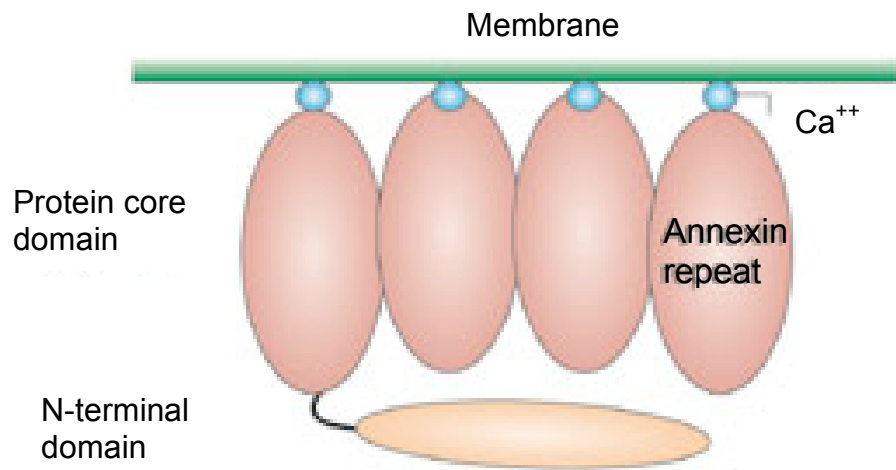


Figure 52 : Représentation schématique d'une annexine attachée à la surface membranaire à travers la liaison avec des ions Ca^{++} (en bleu) (Gerke *et al.*, 2005)

CaD peut également être associée à la formation de podosomes (Gu et al., 2007; Tanaka et al., 1993) puisque la surexpression de cette protéine supprime leur formation induite par le traitement de cellules de muscles lisses avec du phorbol dibutyrate (Gu et al., 2007).

CaD peut être régulée par phosphorylation (Borbiev et al., 2004; D'Angelo et al., 1999; Garcia et al., 2002; Gu et al., 2007; Hai and Gu, 2006; Kordowska et al., 2006; Mak et al., 1991; Yamakita et al., 1992). La phosphorylation de CaD par les protéines ERK diminue la capacité de CaD à stabiliser les filaments d'actine (Gu et al., 2007). Par exemple, durant la progression du cycle cellulaire, la phosphorylation des résidus sérine 497 et 527 de CaD facilite le désassemblage des fibres de stress d'actine et l'étalement post-mitotique des fibroblastes (Gu et al., 2007). L-CaD est alors visible dans le cytoplasme de façon diffuse mais également en co-localisation avec l'actine.

Chez des fibroblastes normaux, bien qu'elle semble exclue des adhérences focales, L-CaD est distribuée périodiquement le long des fibres de stress et sa phosphorylation réduit partiellement son affinité pour l'actine (Hai and Gu, 2006).

VI.4. Annexine 2

Les annexines sont des protéines régulées par le Ca^{++} . En présence de Ca^{++} , ces protéines lient les surfaces membranaires chargées négativement (figure 52). Cette propriété permet aux annexines de réguler des fonctions cellulaires associées aux membranes comme l'organisation de domaines membranaires et/ou la liaison du cytosquelette aux membranes, certaines étapes de l'endocytose, de l'exocytose et le flux d'ions, comme le Ca^{++} ou le Cl^- à travers les membranes comme. Les annexines lient la membrane via la surface convexe du domaine C-terminal conservé qui présente une forme en courbe (Gerke et al., 2005). L'annexine A2 (ANXA2) s'associe à des phospholipides membranaires chargés négativement spécifiques comme les phosphatidylsérines et les phosphatidylcholines (Caplan et al., 2004). ANXA2 lie la protéine S100A10 (ou p11) via son petit domaine N-terminal (24 acides aminés). L'interaction de 2 molécules de ANXA2 et deux molécules de S100A10 génère la formation d'un hétérotétramère (Rescher and Gerke, 2008). Il a été montré que cette interaction est nécessaire à ANXA2 afin de lier la membrane plasmique et stabiliser l'assemblage de l'actine (Gerke et al., 2005; Thiel et al., 1992). ANXA2 possède des propriétés requises pour intégrer les signaux dépendants du Ca^{++} avec la dynamique de l'actine au niveau de sites en contact avec la membrane (Hayes et al., 2004).

Trois transcrits différents issus d'un épissage alternatif codent pour des isoformes différentes de ANXA2 (Upton and Moss, 1994). Cette protéine peut présenter différentes localisations subcellulaires, de nombreuses modifications post-traductionnelles et est sensible à l'oxydation (Babiyshuk et al., 2002; Erikson and Erikson, 1980; Glenney and Tack, 1985; Lauvrak et al., 2005; Singh and Liu, 2000). L'ubiquitinylation de ANXA2 facilite sa liaison à l'actine. La protéolyse du domaine N-terminal de ANXA2 ainsi que la phosphorylation sur la tyrosine 23 ou les résidus serine 11 et 25 de ANXA2 inhibe sa liaison aux phospholipides et à l'actine suite à un changement de conformation (Gerke and Moss, 2002; Singh, 2007). Lorsque ANXA2 est phosphorylée sur la tyrosine 23, elle permet la déphosphorylation de la cofiline, qui devient alors active et induit le désassemblage des filaments d'actine par séquestration de l'actine globulaire. Cette activation de la cofiline par ANXA2 pourrait dépendre de l'inactivation des LIMK (LIM-kinase possédant des domaines LIM riches en cystéines et contenant 2 doigts de zinc) responsables du maintien de la cofiline phosphorylée (de Graauw et al., 2008).

La déplétion de ANXA2 dans des cellules de la lignée HeLa et de la lignée MRCD (« rat mammary cell line ») par utilisation de siRNA conduit à l'accumulation de fibres de stress et à une perte d'activité rétractile et protrusive des cellules (de Graauw et al., 2008).

BUT DU TRAVAIL

Des FDHs soumis à un stress oxydatif subléta1 présentent des caractéristiques communes avec des FDHs en sénescence répliative. Ces cellules ne peuvent plus se diviser et présentent une activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal), une morphologie étalée et une expression génique altérée. Ce phénotype a été nommé sénescence induite prématurément par un stress (SIPS). Différents types de stress permettent l'induction de la sénescence prématurée, comme un stress unique avec H_2O_2 , ou des stress répétés aux UVB, au *t*-BHP ou encore à l'éthanol.

Durant ce travail, le modèle de SIPS utilisé a consisté à traiter une seule fois des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 à une concentration subléta1 unique. Ce modèle a été transféré du laboratoire de Q.M. Chen (Université d'Arizona, USA) et étudié dans notre laboratoire pour la première fois par Christophe Frippiat. Durant sa thèse, Christophe Frippiat a mis en évidence que le « Transforming Growth Factor β -1 » (TGF- β 1) est surexprimé après un stress subléta1 des FDHs IMR-90 avec 150 μ M de H_2O_2 et que cette cytokine est responsable de l'apparition de la morphologie sénescence, de la SA- β gal et de la surexpression de l'ostéonectine, la fibronectine, l'apolipoprotéine J et de SM22 (Frippiat et al., 2001). Ces effets du TGF- β 1 sont partiellement bloqués par utilisation d'un anticorps neutralisant le TGF- β 1 ou le T β R-1. Seul le blocage du cycle cellulaire subsiste dans ces conditions. Suite à ce travail, nous nous sommes demandés si le TGF- β 1 est le seul facteur responsable de l'apparition de la sénescence prématurée et s'il était possible d'identifier d'autres protéines agissant sur l'apparition des marqueurs de la sénescence de manière indépendante du TGF- β 1. Nous nous sommes également demandés quels sont les mécanismes moléculaires responsables de l'apparition de la morphologie sénescence. En effet, nous ne savons pas quelles protéines interviennent dans l'établissement de la morphologie étalée, aplatie et irrégulière des FDHs IMR-90.

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons donc identifié des protéines qui pourraient être impliquées dans l'apparition du phénotype sénescence des FDHs IMR-90 après traitement avec H_2O_2 , et ce, de manière indépendante du TGF- β 1. Les techniques des gels à 2 dimensions et de la spectrométrie de masse ont été utilisées dans de nombreuses études décrites dans la littérature et ont fortement évolué au cours de la dernière décennie. Leur utilisation combinée représente donc un outil de choix pour l'identification de protéines présentant des variations de néosynthèse.

Nos premiers travaux ont permis d'identifier des protéines néosynthétisées au sein des FDHs IMR-90 entre 48 et 72 h après un traitement avec H_2O_2 à une concentration subléta1 après stimulation avec du TGF- β 1 ainsi qu'après traitement avec H_2O_2 durant lequel le TGF- β 1 a été bloqué. Cette étude a été réalisée par marquage métabolique des protéines avec de la méthionine

[³⁵S], la séparation de ces protéines par gels à 2 dimensions et l'identification de ces protéines par spectrométrie de masse. Le marquage a été réalisé entre 48 et 72 h après le début du traitement avec H₂O₂, car cela correspond au moment auquel apparaissent les caractéristiques de la sénescence prématurée citées plus haut, comme la morphologie étalée. Il est donc raisonnable de penser que, à ce moment, la réponse immédiate suite au stress est terminée et que ce type de marquage protéique permet d'étudier uniquement les changements d'expression à long terme participant à l'établissement ou au maintien du phénotype de la sénescence prématurée. En effet, le marquage métabolique permet de visualiser des changements d'expression protéique qui ont lieu durant un laps de temps après le traitement (Dierick et al., 2002a).

Parmi les protéines mises en évidence au cours de ces études, nous avons poursuivi notre travail sur des protéines étant définies dans la littérature pour être impliquées dans la stabilisation des filaments d'actine et donc des fibres de stress. En effet, nous savions que l'équipe de Chen avait mis en évidence une augmentation du nombre de fibres de stress dans les FDHs IMR-90 traités avec H₂O₂ à une concentration sublétales. Nous avons donc étudié la néosynthèse de HSP27, de l'eitrine et de la caldesmone par Western blot après incubation des FDHs IMR-90 avec un inhibiteur de la traduction afin de valider les résultats obtenus par gels à 2 dimensions.

L'étude protéomique suggérait aussi une augmentation de la néosynthèse de GAP-Cdc42, une protéine inhibitrice de Cdc42 et Rac1. Puisque Cdc42 et Rac1 sont également définies dans la littérature pour être impliquées dans la formation de structures constituées d'actine (filopodes et lamellipodes), nous avons étudié l'activation de ces deux Rho-GTPases à différents temps qui suivent le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂.

Nous avons ensuite réalisé une étude fonctionnelle en étudiant l'implication de Cdc42 et Rac1 dans l'apparition de la morphologie sénescence. De plus, nous avons analysé les liens hypothétiques entre l'activation de Cdc42, de Rac1, de p38^{MAPK}, la phosphorylation de HSP27 et la phosphorylation de la L-caldesmone à différents temps après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Cette partie du travail est sous presse dans « Free Radical Biology and Medicine ».

Nous nous sommes ensuite demandés quel mécanisme était responsable de l'activation de Cdc42 par p38^{MAPK} et inversement. Nous avons choisi de porter ce travail sur la cavéoline 1. En effet, la cavéoline 1 a été décrite dans la littérature comme étant impliquée dans l'activation de Rac1 et Cdc42 lors de la sénescence répliquative de FDHs. D'autres auteurs ont montré que p38^{MAPK} est responsable de l'activation de la cavéoline 1 suite au traitement de fibroblastes murins transformés. Cette équipe a également mis en évidence l'implication de la cavéoline 1 dans l'apparition de l'activité SA β-gal, la morphologie sénescence et l'arrêt irréversible de prolifération. Nous avons donc étudié l'abondance de la cavéoline 1 ainsi que sur son

implication dans l'arrêt du potentiel de prolifération, l'activité SA- β gal, la morphologie sénescence et l'activation de Cdc42, p38^{MAPK} et la phosphorylation de la L-caldesmone. Cette partie du travail est soumise pour publication dans « FEBS Letters ».

Dans la dernière partie du travail, nous avons réalisé une seconde étude protéomique afin de compléter les données obtenues lors de l'étude portant sur la néosynthèse protéique. En guise d'ouverture à de futures études, nous avons décidé de nous cibler sur les protéines membranaires présentant une variation d'abondance au sein des FDHs IMR-90 à 3 jours après le traitement avec H₂O₂ à une concentration sublétales. Ces protéines jouent des rôles importants dans divers processus biologiques comme dans la signalisation cellulaire, le contact entre les cellules et avec le substrat ou encore le transport de molécules vers ou hors de la cellule. Il est donc important de comprendre les mécanismes régulant ce type de protéines. Ce type d'étude n'a jamais été réalisé dans le cadre de la sénescence prématurée. Pour réaliser cette étude protéomique, nous avons choisi, comme première approche, de marquer les protéines avec des sondes fluorescentes afin d'identifier de nouveaux marqueurs membranaires de la sénescence prématurée. Parmi les protéines identifiées, nous avons porté notre attention sur l'annexine A2. Cette partie du travail est sous presse dans « Experimental Gerontology ».

Dans la suite du manuscrit, nous avons choisi de parler d'observations à court terme ou à long terme selon que nous étudions les réponses cellulaires ayant lieu respectivement jusqu'à 8 heures après le traitement H₂O₂ ou ayant lieu à 1, 2, 3 et 4 jours après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂.

RESULTATS

I. Etude de la néosynthèse protéique et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la sénescence prématurée induite par un stress subléta avec H₂O₂

In vitro, des cellules diploïdes humaines, comme des FDHs, présentent une capacité proliférative limitée conduisant à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Il s'agit de la sénescence répliative. Ces cellules présentent également une morphologie étalée, une activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) et une surexpression de l'ostéonectine, la fibronectine, l'apolipoprotéine J et SM22.

Lorsque nous avons commencé ce travail, il venait d'être démontré au laboratoire que la voie du TGF- β 1 et de p38^{MAPK} joue un rôle essentiel dans l'apparition de certaines caractéristiques de la sénescence lorsque des FDHs IMR-90 sont traités avec H₂O₂ à une concentration subléta (Fripiat et al., 2001; Fripiat et al., 2002). Une partie du travail de C. Fripiat était d'étudier l'implication du TGF- β 1 sur l'apparition des caractéristiques (morphologie étalée, activité SA β -gal, abondance relative des transcrits de 4 gènes marqueurs, arrêt irréversible de prolifération) de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 suite à un traitement avec H₂O₂. C. Fripiat a donc étudié ces marqueurs de la sénescence après stimulation des cellules avec du TGF- β 1 et après traitement des cellules avec H₂O₂ en présence d'un anticorps neutralisant le TGF- β 1. Il a observé que les anticorps neutralisants induisent un étalement moins prononcé des FDHs IMR-90 traités avec H₂O₂. De plus, la proportion de cellules positives pour l'activité SA β -gal après traitement H₂O₂ (\pm 50%) n'est plus que de 20% en présence des anticorps neutralisant alors qu'elle est proche de 40% après stimulation avec le TGF- β 1. Concernant l'abondance relative des transcrits de SM22, la fibronectine, l'ostéonectine et l'apolipoprotéine J, une surexpression plus faible a été observée pour les cellules traitées avec H₂O₂ en présence d'anticorps neutralisant le TGF- β 1 (environ 1,5x par rapport aux cellules controles) en comparaison avec les cellules traitées uniquement avec H₂O₂ (entre 1,5x et 2x par rapport aux cellules controles), alors qu'elle est toujours induite après stimulation avec du TGF- β 1 (entre 1,5 x et 2,5 x par rapport aux cellules controles). Hormis le fait que la neutralisation de ces effets n'est pas complète, l'arrêt du cycle cellulaire est toujours observable à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ en présence de ces anticorps neutralisants. Une des hypothèses étaient donc qu'il pouvait exister un (des) mécanisme(s) indépendant(s) du TGF- β 1 responsable(s) du blocage du cycle cellulaire et peut-être de l'établissement du phénotype sénescant.

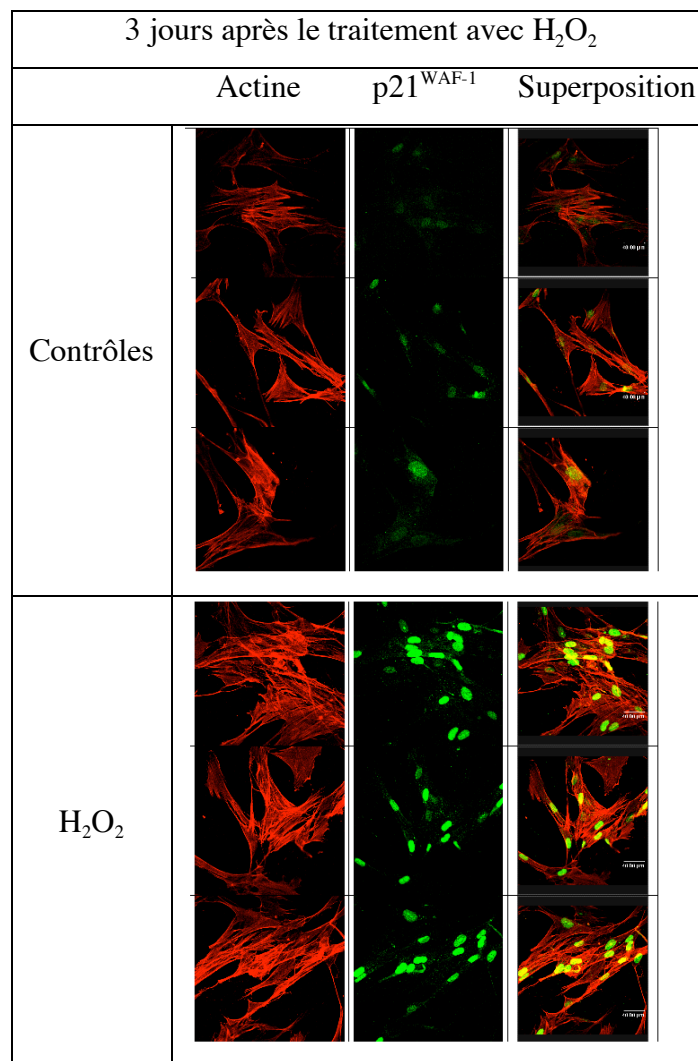


Figure 53 : Effet du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ sur l'organisation de l'actine et sur l'abondance de p21^{WAF-1}. A 2 jours après le traitement avec H₂O₂, les cellules sont repiquées sur des couvre-objets en verre à 20.000 cellules/cm² et fixées au jour 3 après le traitement avec H₂O₂. L'actine-β est marquée avec la phalloïdine. p21^{WAF-1} est immunomarkée avec des anticorps primaires monoclonaux de souris (détection de p21^{WAF-1} de l'homme, la souris et du rat) et des anticorps secondaires (IgG de chèvre) marqués au fluorochrome Alexa Fluor 488. Les micrographies représentatives en fluorescence sont obtenues par utilisation de la microscopie confocale semi-quantitative.

Nous avons donc réalisé une étude sur la néosynthèse protéique ayant lieu à long terme (entre deux à trois jours) après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 en concentration sublétales et en présence ou non des anticorps neutralisants le TGF- β 1. Des FDHs IMR-90 stimulés avec du TGF- β 1 et des FDHs en conditions contrôles ont également été considérés. Des 2DGE ont été réalisés afin de comparer les profils d'expression protéique des différentes conditions. La spectrométrie de masse nous a permis d'identifier les protéines présentant des variations de néosynthèse entre ces différentes conditions.

Avant d'entamer cette étude protéomique, nous avons vérifié que nos conditions de traitement avec H_2O_2 entraînaient bien la sénescence prématurée (Chen et al., 2000c; Fripiat et al., 2002). Outre la vérification des marqueurs de la sénescence comme l'arrêt irréversible du potentiel de prolifération et l'augmentation du nombre de FDHs positifs pour la SA β -gal, nous avons étudié les fibres de stress d'actine et la présence de la protéine p21^{WAF-1} après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Ces résultats préliminaires sont décrits ci-dessous.

I.1. Résultats préliminaires : fibres de stress d'actine et détection de p21^{WAF-1} lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 induite par H_2O_2

Il a été démontré auparavant que les FDHs IMR-90 présentent une morphologie étalée grâce, en partie, à un nombre plus élevé de fibres de stress (Chen et al., 2000c). Ainsi, avant d'entamer une étude plus approfondie, nous avons vérifié que nous retrouvions bien cette augmentation de fibres de stress d'actine dans notre modèle. Nous avons réalisé un co-marquage de l'actine et de p21^{WAF-1} et les avons observé en microscopie confocale. Ces données n'étant pas reprises dans l'article présenté ci-après, nous présentons ici des résultats représentatifs d'expériences réalisées en triplicats (figure 53). En accord avec la littérature, nous avons bien observé une détection plus marquée du réseau de fibres d'actine dans les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 (Chen et al., 2000c). De plus, p21^{WAF-1} semble plus abondant chez les FDHs IMR-90 présentant un réseau de fibres d'actine plus dense.

Nous pouvions ensuite étudier si le TGF- β 1 contrôle, partiellement ou non, la sénescence prématurée induite par H_2O_2 .

I.2. Rôle des changements de néosynthèse protéique indépendants du TGF- β 1, de p38 α ^{MAPK} et Cdc42 dans la morphogenèse sénescence prématurée induite par le peroxyde d'hydrogène

Dans ce premier article, nous présentons les résultats concernant l'identification de

nouvelles protéines pouvant être impliquées dans l'établissement de la sénescence prématurée, parmi lesquelles l'eitrine, la L-caldesmone, HSP27 et la GAP-Cdc42. Nous montrons ensuite qu'il s'agit bien de néosynthèse pour l'eitrine, la L-caldesmone et HSP27, protéines connues pour jouer un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Nous nous penchons ensuite sur l'activation d'autres protéines pouvant également stabiliser l'organisation de l'actine. En effet, puisque la néosynthèse de la GAP-Cdc42 augmente à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 , nous sommes demandés si Cdc42 et Rac1, deux protéines régulées négativement par la GAP-Cdc42, présentent des variations d'activité après ce traitement. Nous terminons cette étude par l'étude de l'implication de Cdc42, Rac1 et $p38^{MAPK}$ dans la morphogenèse sénescence des FDHs IMR-90 après traitement avec H_2O_2 .

Le matériel supplémentaire de cet article est présenté à la page 83 du manuscrit.

Les tables S3 et S4 du matériel supplémentaire concernant les données obtenues en spectrométrie de masse sont présentées en annexe 1 à la page 170 du manuscrit.

Available online at www.sciencedirect.com

Free Radical Biology & Medicine xx (2008) xxx–xxx

www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original Contribution

Role of TGF- β 1-independent changes in protein neosynthesis, p38 α ^{MAPK}, and cdc42 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis

Aline Chrétien^a, Jean-François Dierick^{b,1}, Edouard Delaive^a, Martin Røssel Larsen^c, Marc Dieu^a,
Martine Raes^a, Christophe F. Deroanne^d, Peter Roepstorff^c, Olivier Toussaint^{a,*}

^a Research Unit on Cellular Biology, University of Namur, B-5000 Namur, Belgium

^b Institute of Molecular Biology and Medicine, University of Brussels, Gosselies, Belgium

^c Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense M, Denmark

^d Laboratory of Connective Tissues Biology, CBIG/GIGA Research Center, University of Liège, Sart Tilman, Belgium

Received 7 November 2007; revised 21 December 2007; accepted 19 January 2008

Abstract

The role of TGF- β 1 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis has been described. The aim of this work was to investigate whether TGF- β 1-independent changes in protein synthesis are involved in this morphogenesis and to study possible mechanisms occurring earlier than TGF- β 1 overexpression. Among the multiple TGF- β 1-independent changes in protein neosynthesis, followed or not by posttranslational modifications, identified by proteomic analysis herein, those of ezrin, L-calmodulin, and HSP27 were particularly studied. Rho-GTPase cdc42 was shown to be responsible for p38^{MAPK} activation, in turn triggering phosphorylation of L-calmodulin and HSP27. Cdc42 was also shown to be mainly responsible for the increase in TGF- β 1 mRNA level observed at 24 h after treatment with H₂O₂ and onward. This study further clarified the mechanisms of senescence-like morphogenesis in addition to the previously demonstrated role of TGF- β 1 signaling pathways.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: H₂O₂; Neosynthesis; Proteomics; siRNA; Senescence; cdc42; p38^{MAPK}; Free radicals

In 1961 Hayflick and Moorehead proposed that serial subcultivations of WI-38 human diploid fibroblasts (HDFs) under the usual laboratory conditions available more than 45 years ago (namely under 20% O₂) exhaust the proliferative potential of these cells [1]. This in vitro phenomenon has been historically termed replicative senescence [2,3]. It was shown later that

cultivating human diploid fibroblasts under more physiological O₂ partial pressure (2–5% O₂) prolongs their in vitro life span (for a review see [2]). Legitimately this led to the question whether the molecular mechanisms of senescence are really the same when cells are cultivated under usual laboratory conditions (20% O₂) or under physiological O₂ pressure, even if both are characterized by critical telomere shortening [2]. According to the authors' paradigm, there are two definitions of senescence. The narrowest definition of senescence is "genuine" replicative senescence restricted to irreversible growth arrest triggered by critical telomere shortening, which counts cell generations, in the absence of non-physiological (oxidative) stress (definition 1) [4]. Other authors enlarged this definition to a functional definition encompassing irreversible arrest of proliferative cell types induced by oxidative stress/DNA damage and/or overexpression of proto-oncogenes (definition 2) [2,5].

Considering definition 1 of senescence, cells cultivated under 20% O₂ that irreversibly stop dividing, even after 50 population doublings, are in a stress-induced phenotype that resembles

Abbreviations: 2DGE, two-dimensional gel electrophoresis; CaD, caldesmon; CXM, cycloheximide; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; GAP, GTPase activating protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HDF, human diploid fibroblast; HSP, heat shock protein; IgG, immunoglobulin G; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEM, minimum essential medium; NP-40, Nonidet P-40; pak1, p21-activated kinase; PBD, pak1-binding domain; ppm, mass parts per million; SD, standard deviation; SA β -gal activity, senescence-associated β -galactosidase activity; siRNA, small interfering RNA; *t*-BHP, *tert*-butylhydroperoxide; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

* Corresponding author. Fax: +32 81 72 41 35.

E-mail address: olivier.toussaint@fundp.ac.be (O. Toussaint).

¹ Current address: SGS Life Sciences Services, Wavre, Belgium.

0891-5849/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.026

genuine replicative senescence. The same holds true for cells that have been exposed chronically to a higher pressure of O₂ or to acute sublethal stress, and that was also called “stress-induced senescence-like phenotype” [6]. The word “stasis” was originally used to describe growth arrest of cancer cells induced by antineoplastic molecules. It was proposed to extend the word stasis to the senescence-like phenotype that is induced in normal cells after exposure to DNA-damaging agents [7]. However, the mechanisms of growth arrest might be extremely different between cancer cells, whose cycle is by definition deregulated for many possible reasons, and normal cells exposed to stressful agents. According to definition 2 of senescence, the stress-induced senescence-like phenotype of normal cells should be called “stress-induced senescence.” The phrase “stress-induced premature senescence” was also used because, according to definition 2, this type of senescence could be triggered at population doublings much earlier than the maximum number of population doublings. This work will be based on definition 1 of senescence and we shall use the phrase “stress-induced senescence-like phenotype.”

Our cells are exposed to oxidative stress every day [8]. Oxidative stress damages biomacromolecules like DNA, proteins, and lipids, which participates in aging [9]. A stress-induced senescence-like phenotype is induced between days 2 and 3 after an acute treatment of HDFs with a sublethal concentration of oxidative agents like *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) [10] or H₂O₂ [11–13]. Features of senescence obtained after passaging under 20% O₂ are observed, such as enlarged shape, senescence-associated β -galactosidase activity (SA β -gal), inhibition of cell cycle, and increased mRNA abundance of senescence-associated genes like fibronectin, osteonectin, or apolipoprotein J [10,13,14]. Experiments performed with various types of stress (H₂O₂, UVB, *t*-BHP, or ethanol) under sublethal conditions revealed that transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) mRNA and protein abundance are increased in HDFs in stress-induced senescence-like phenotype. Neutralization of TGF- β 1 or TGF- β 1 receptor II attenuates, but does not suppress, the appearance of several biomarkers of senescence after sublethal exposures to UVB or H₂O₂ [13,15,16]. Increased abundance of TGF- β 1 mRNA was not observed in HDFs expressing the catalytic subunit of telomerase, due to possible interplay between telomerase and the TGF- β 1-related pathways [17,18]. In addition, neutralization of TGF- β 1 does not affect the growth arrest observed in H₂O₂-induced senescence-like phenotype [6]. In other words, TGF- β 1-independent mechanisms exist, which participate in the appearance of a stress-induced senescence-like phenotype.

The aim of this work was to search for TGF- β 1-independent features in the H₂O₂-induced senescence-like phenotype. Cellular proteins are effectors able to directly modify cell functions. Generally speaking, changes in protein neosynthesis are more likely to be linked to alterations in regulation of corresponding genes than changes in protein abundance. The strategy was to perform a proteomics study based on separation of proteins metabolically labeled with radioactive methionine between 46 and 70 h after treatment of IMR-90 HDFs with a sublethal concentration of H₂O₂ in the presence of neutralizing antibodies against TGF- β 1 or not. The results of the analysis were com-

pared to results obtained in a parallel study in which IMR-90 HDFs were stimulated with TGF- β 1 or not.

Several interesting protein candidates were identified that can play a role in the appearance of a stress-induced senescence-like phenotype. We focused on proteins that can regulate senescent morphogenesis like cdc42/rac1 GTPase-activating protein, heat shock protein 27 (HSP27), and L-caldesmon, in relationship with phosphorylation of p38^{MAPK}. Functional studies with siRNA revealed the roles of some of these proteins in the appearance of a stress-induced senescence-like phenotype.

Materials and methods

Cell culture, stress, and stimulation

IMR-90 fetal lung HDFs were grown in minimal essential medium (MEM) (Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). IMR-90 HDFs at 50% of in vitro proliferative life span were seeded at a density of 24×10^3 cells/cm². The cells were treated with different experimental conditions (Fig. 1A). The beginning of the treatment with H₂O₂ was defined as day 0. Under condition 1, 1 day after seeding, cells were treated for 1 or 2 h with 150 μ M H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Germany) diluted in MEM + 10% FBS. After the treatment with H₂O₂, the cells were rinsed twice with PBS, pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl). A 2-h treatment represented sublethal conditions as shown earlier [13]. Under condition 2, the cells were incubated with TGF- β 1 (10 ng/ml) (R&D Systems, Oxon, UK) diluted in MEM+10% FBS with new TGF- β 1 every day for 3 days. Under conditions 3 and 4, IMR-90 HDFs were incubated or not with anti-TGF- β 1 antibodies (R&D Systems) diluted (3 μ g/ml) in MEM + 10% FBS with new MEM, FBS, and antibodies provided every day for 3 days. Under condition 5, incubation with anti-TGF- β 1 antibodies started at 12 h before treatment with H₂O₂ and went on during treatment. New MEM, FBS, and anti-TGF- β 1 antibodies were provided every day for 3 days after treatment with H₂O₂.

Estimation of DNA synthesis and SA β -galactosidase activity

At 1 day after the stress, cells were seeded in 24-well plates at 10,000 cells/well in MEM + 10% FBS. One microcurie of [³H]thymidine (sp act 2 Ci/mmol; Du Pont, NEN, USA) was added to MEM + 10% FBS between the second and the third day. Quantification of radioactivity was performed classically using a scintillation counter (Packard Instrument Co., USA) as described before [10]. Data were normalized to the cellular protein content assayed by the Folin method [19] before [³H]thymidine incorporation. The results are expressed as means of triplicates \pm SD.

Cells were seeded 1 day after the treatment with H₂O₂ in six-well plates at 1000 cells/well in MEM + 10% FBS. SA β -gal activity was determined 2 days later [12]. The population of SA β -gal-positive cells was determined by counting 400 cells per well. The proportion of cells positive for the SA β -gal activity is given as a percentage of the total number of cells counted in each well.

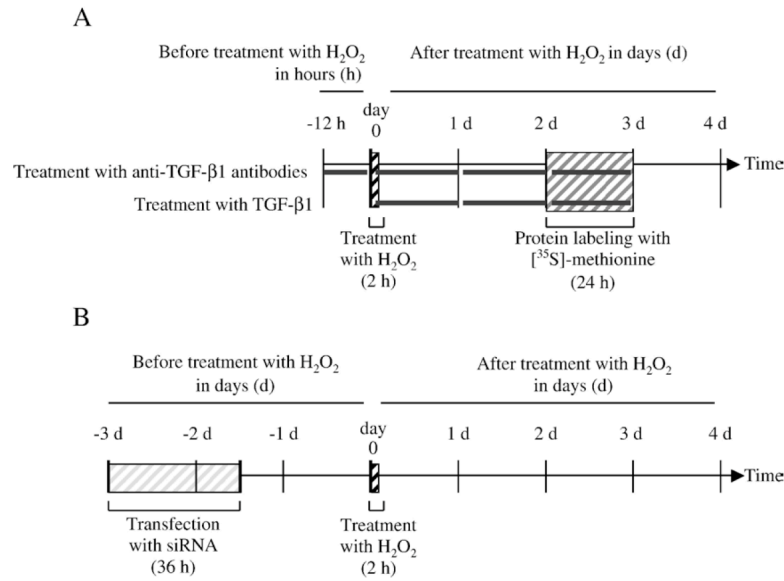


Fig. 1. (A) Schematic representation of the schedule of IMR-90 HDF treatment with H₂O₂, TGF-β1, or anti-TGF-β1 antibodies and metabolic labeling of proteins. (B) Schematic representation of the schedule of IMR-90 HDF transfection with siRNA and treatment with H₂O₂.

Protein labeling, sample preparation, and 2D gel electrophoresis (2DGE)

Cellular proteins were metabolically labeled with [³⁵S]methionine (50 μCi/600 μl/well) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) diluted in MEM + 150 mM cold methionine (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) for 24 h, starting at 46 h after treatment with H₂O₂. IMR-90 HDFs were washed twice with ice-cold PBS buffer and lysed in ice-cold lysis buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 4% Chaps, 1% DTT, 2% pharmalytes 3/10 (Amersham Biosciences), and 4% protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)). Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (Merck) and assayed using the Bradford reagent (Bio-Rad, München, Germany). Counts per minute (cpm) of protein extracts were measured with a liquid scintillation analyzer (TRI-CAR B 2100 TR; Packard Biosciences, Zellik, Belgium).

First-dimension isoelectric focusing gel was carried out on immobiline strips providing a continuous pH 4–7 gradient (IPG strips; Amersham Biosciences). A quantity of labeled sample corresponding to 3×10^6 cpm (approximately 1.5 μg of solubilized proteins) was diluted in rehydration solution (6 M urea, 2% Chaps, 0.28% DTT, 0.5% v/v IPG buffer, pH 4–7 (Amersham Biosciences), and 0.001% bromophenol blue (Merck)). IPG strips were rehydrated for 13 h at 20 °C on an IPGphor isoelectric focusing system (Amersham Biosciences) with a low voltage at 20 V. Proteins were focused for 1 h at 200 V, 1 h at 500 V, 1 h at 1000 V, and 17 h at 8000 V (steady state). Preparative gels were performed similarly with a final amount of 200 μg of protein per gel.

For the second-dimension, IPG strips were equilibrated for 15 min under gentle shaking in DTT equilibration buffer (0.045 M Tris-HCl, pH 8.8 (Merck), 6 M urea (Amersham Biosciences), 30% glycerol (Merck), 2% SDS (MP Biomed-

icals, Eschwege, Germany), 1% DTT (Amersham Biosciences), 0.001% bromophenol blue (Merck)), followed by 15 min under gentle shaking in iodoacetamide equilibration buffer (0.045 M Tris-HCl, pH 8.8 (Merck), 6 M urea (Amersham Biosciences), 30% glycerol (Merck), 2% SDS (MP Biomedicals), 2.5% iodoacetamide (Amersham Biosciences), 0.001% bromophenol blue (Merck)). Precast SDS-PAGE gels (12.5%; 255 × 196 × 1 mm) (Ettan DALT II Gel 12.5 and Ettan DALT Buffer Kit; Amersham Biosciences) were used. First, 5 W/gel was applied, followed by a constant power at 84 W/gel until bromophenol blue reached the bottom of gel. Gels were incubated for 1 h in fixing solution (25% isopropanol (Merck), 10% acetic acid (Merck), 2% glycerol (Merck)) and for 30 min in Amplify Fluorographic Reagent (Amersham Biosciences) under mild shaking. The gels were dried at 80 °C for 2 h and exposed to Hyperfilm MP (Amersham Biosciences) at -80 °C for 4 days.

Image acquisition was carried out by scanning the films (Image Master Labscan V 2003.01 software; Amersham Biosciences). Quantitative analysis was performed from 15 analytical 2DGE images (three gels per condition): spot detection and spot matching were performed, and spot volume was normalized with the total optical density of all the spots, followed by differential analysis. A cutoff value was set at a twofold increase or decrease. The differences in spot intensities were analyzed by Student *t* test. We checked the results of this analysis visually using the images acquired from the gels.

Protein identification

Preparative 2DGE were performed according to the same protocol as for the analytical gels except 200 μg of nonlabeling proteins was mixed with samples labeled with radioactive methionine. A total of 10 preparative 2DGE gels were prepared and 26 spots of interest could be excised from every dried gel.

The gel plugs were rehydrated with water (Milli-Q system; Millipore, Bedford, MA, USA) and washed twice with water (5 min) and twice with 100% acetonitrile (5 min) with shaking at 14,000 rounds per minute. The gel plugs were dried by vacuum centrifugation. Trypsin (10 ng/ μ l) (Promega, Madison, WI, USA) dissolved in 50 mM NH_4HCO_3 , pH 7.8, was added. In-gel digestion was performed as described [20]. The digestion went on for 14–16 h at 37 °C. The supernatants were kept at -20 °C.

Custom-made chromatographic microcolumns were used for desalting and concentration of the thawed peptide mixture before mass spectrometry (MS) analysis. These columns were constricted GELoader tips (Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 0.2 μ l of POROS RP R2 material (20 μ m bead size; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). The columns were equilibrated with 10 μ l 1% trifluoroacetic acid (TFA). For each spot, an aliquot of the digestion supernatant was loaded onto the column. Gentle air pressure from a 10-ml syringe pushed the liquid through the columns. The column was washed with 10 μ l 1% TFA. Peptides were eluted directly onto the MALDI target with 0.8 μ l of matrix solution (10 μ g/ μ l of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 70% acetonitrile and 0.1% TFA). Manual data acquisition was performed using an Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer with TOF/TOF optics (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), in positive reflector mode as described [21]. In the manual setup, an MS spectrum was first recorded and analyzed manually by a first round of peptide mass search. Peaks were selected for MS/MS analysis based on the obtained results. MS/MS spectra were included in the analysis and the total scores reported.

For the liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), the peptide separation was achieved by using an LC-Packings Ultimate 3000 nanoflow system (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). Peptides were loaded with a high flow rate of 3 μ l/min onto a custom-made 1-cm precolumn (75 μ m i.d. fused silica with kasil-frits retaining the Reprosil C18, 3.5- μ m reversed-phase particles (Dr. Maisch GmbH, Germany)). Nanoflow reversed-phase HPLC was then performed with a flow of 0.1 μ l/min through a custom-made 8-cm analytical column (50 μ m i.d., packed with Reprosil C18, 3.5- μ m reversed-phase particles (Dr. Maisch GmbH)). Peptides were eluted directly into the ESI source of a Q-TOF Micro tandem mass spectrometer (Waters/Micromass, Manchester, UK) using a stepped linear gradient. The steps were 0–10% B in 5 min, 10–50% B in 30 min, and 50–100% B in 5 min. Solvent A was 0.5% acetic acid (Merck) and B was 80% acetonitrile in 0.5% acetic acid (Merck). Mass- and charge-dependent collision energies were used for peptide fragmentation.

All spectra were converted into ASCII format. The MALDI-MS, MS/MS, and LC-MS/MS peptide mass maps were analyzed by using the MoverZ software (www.proteometrics.com). All spectra underwent an internal two-point calibration using autodigested trypsin peak masses, m/z 842.51 and 2211.10 Da, and the search was performed with a signal-to-noise ratio of 15. Protein identification was performed by searching the MALDI-MS spectra alone and/or in combination with MS/MS spectra

from the same spot. Data were used to search protein candidates by sequence similarity against available human protein database NCBI nr (05/05) (20070210, 4,565,699 sequences) using an in-house Mascot search server (version 1.8) (Matrix Sciences, London, UK). For MALDI-MS analysis, peptide mass fingerprinting search parameters were as follows: 70 ppm for peptide mass tolerance, a single tryptic miss cleavage allowed, oxidation of methionine residues as partial modification. For MALDI-MS in combination with MS/MS analysis, peptide mass fingerprinting search parameters were as follows: 70 ppm for peptide mass tolerance and 0.5 Da for fragment mass tolerance, a single tryptic miss cleavage allowed, carbamidomethylation of cysteine residues as fixed modifications, and oxidation of methionine residues as partial modification. For LC-MS/MS analysis, peptide mass fingerprinting search parameters were as follows: 150 ppm for peptide mass tolerance and 0.6 Da for fragment mass tolerance, a double tryptic miss cleavage allowed, carbamidomethylation of cysteine residues as fixed modifications, and deamidation of asparagine and glutamine residues, oxidation of methionine residues as partial modification, ion fragment mass accuracies of 0.5 Da. Only significant hits as defined by the Mascot probability analyses (protein scores greater than 75 are significant ($p < 0.05$; p is the probability that the observed match is a random event)) were accepted but always verified manually. The false positive rate of approximately 5% was found sufficient because the purpose of the study was to identify protein and not to perform high-confidence phosphorylation or other modification site identification. For MS/MS data, significant hits were carefully inspected manually to eliminate false positives, based on criteria such as ion score and expect value. When peptides matched multiple members of a protein family, of which their criteria of acceptance did not enable us to select one member, only the general name of the protein was taken into account. When peptides matched a specific member of a protein family, and not the other members, the name of the isoform was taken into account. All Mascot scores and E values were reported for the MALDI-MS, for the MALDI-MS in combination with MS/MS, and for the LC-MS/MS search results in Supplementary (S) Table S.3 or S.4.

One-dimensional Western blot analysis

Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Merck), 100 mM NaCl (Merck), 10% glycerol (Merck), 1% NP-40 (Sigma-Aldrich), 0.1% SDS (MP Biomedicals), 0.5% deoxycholate (Merck), 2 mM DTT (Amersham Biosciences), 4% protease inhibitor cocktail (Roche) and 4% phosphatase inhibitor buffer (containing Na_3VO_4) (Merck), 1 M p -nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich), 1 M glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate (Sigma-Aldrich), and 1 M NaF (Merck)). The cell lysates were sonicated. Proteins were assayed using the Bradford reagent (Bio-Rad) before electrophoresis (10% SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Biosciences), and probed with the following antibodies: anti-phospho-p38^{MAPK} (Thr180/Tyr 182) mouse IgG, anti-p38 α ^{MAPK} rabbit IgG, anti-phospho-HSP27 (Ser 82) rabbit IgG, anti-phospho-L-CaD (Ser

789) rabbit IgG, anti-phospho-ezrin (Tyr 353) rabbit IgG, anti-ezrin rabbit IgG (Cell Signaling, Lake Placid, NY, USA), anti-HSP27 goat IgG, anti-p21 mouse IgG, anti- α -tubulin mouse IgG (Clone B-5-1-2; Sigma–Aldrich), anti-L-CaD mouse IgG, anti-rac1 mouse IgG, anti-cdc42 mouse IgG (BD Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgium), and horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (anti-mouse and anti-rabbit antibodies; Amersham Biosciences; anti-goat antibodies; Dako-Cytomation, Glostrup, Denmark). α -Tubulin was used as a reference protein to check equal loading on the gels. The bands were visualized after incubation with chemiluminescent substrates (ECL detection kit; Amersham Biosciences). Scanning was performed with the Image Master Labscan version 2003.01 software (Amersham Biosciences).

For analyzing involvement of ERK protein in the phosphorylation of CaD, we analyzed protein abundance by Western blot after the use of the ERK-specific chemical inhibitor U0126 (Cell Signaling) at 20 μ M for 1 h before treatment and during treatment with H₂O₂.

Semiquantitative real-time RT-PCR analysis

Cells from different experimental conditions were washed once with cold PBS. Total RNA was extracted (RNAagents, Total RNA Isolation System; Promega). Starting from 2 μ g total RNA, mRNA was retrotranscribed using oligo(dT)_{12–18}, dNTP, and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sequences of the primers were determined (Primer Express 1.5 software; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table S.1A). cDNA and primer concentrations were experimentally determined for the PCRs to remain in the exponential zone of amplification for each gene. Real-time PCR was performed using SYBR green (Applied Biosystems) as intercalating agent. We used the SDS 2.2.1 software connected to the 7900 HT Fast real-time PCR system (Applied Biosystems). The conditions of PCR were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C and the specificity of amplification was checked by performing a dissociation curve with a gradient from 60 to 95 °C. The abundance of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as reference for semiquantification with the classical $\Delta\Delta C_T$ method [22].

Cell viability

Cell viability was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (Sigma–Aldrich) [23]. For testing the cytotoxicity of cycloheximide (CXM), IMR-90 HDFs were seeded at a density of 24×10^3 cells/cm². At 24 h after seeding, IMR-90 HDFs were incubated for 24 h with CXM diluted in MEM + 10% FBS at 2, 10, or 20 μ g/ml. The MTT solution was added for 3 h at 37 °C. Then, the MTT solution was discarded. Lysis buffer (20% SDS (MP Biomedicals), 33.3% *N,N*-dimethylformamide (Merck), pH 4.7) was added and extraction was performed for 3 h under gentle shaking at 37 °C in the dark. The OD of the lysates was recorded at 570 nm (plate reader Ultramark Microplate Imaging System; Bio-Rad).

GTPase assays

The EZ-Detect rac1 or cdc42 Activation Kit was used (Pierce, Rockford, IL, USA). Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in ice-cold lysis buffer (25 mM Tris–HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% NP-40, 1 mM DTT, and 5% glycerol with 4% protease inhibitor cocktail (Roche)) after 1 h of treatment with H₂O₂ and at 1, 2, and 3 days after the beginning of treatment with H₂O₂. Lysates were centrifuged for 8 min at 16,000 $\times g$. Aliquots of supernatants were used for protein concentration assays using the Bradford reagent (Bio-Rad). The remainder of the supernatants was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

For pull-down assays, 500 μ g of proteins was incubated for 1 h at 4 °C under gentle shaking with 20 μ g of the GST–PBD (pak1 (p21-activated protein kinase 1) binding domain) fusion protein and with SwellGel immobilized-glutathione disks. Active rac1 and cdc42 bind specifically to the PBD of pak1 [24,25]. The beads were washed three times in lysis buffer and boiled in 50 μ l SDS sample buffer (125 mM Tris–HCl, pH 6.8, 2% glycerol, 4% SDS, and 0.05% bromophenol blue). Western blots were performed as described before. Specific antibodies to rac1 and cdc42 were used to detect their GTP form and total form.

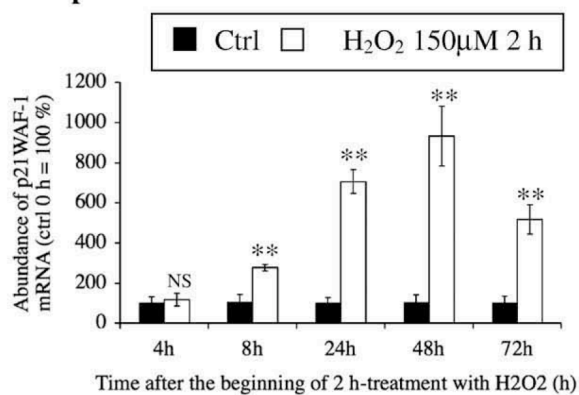
Lysate control treatments were performed to ensure the pull-down procedure was working properly. Cell lysates were incubated with GTP γ S (0.1 mM) or GDP (1 mM) in presence of EDTA, pH 8.0 (10 mM) (Merck), as the respective positive or negative control for the pull-down assays. Reaction was terminated by placing the sample on ice and adding MgCl₂ (60 mM) (Merck).

As positive controls for rac1 or cdc42 activation, IMR-90 HDFs were incubated for 1 h respectively with 10 ng/ml EGF (R&D Systems) or with 100 ng/ml (0.1 μ M) bradykinin (Sigma–Aldrich) before protein extraction. As negative control for rac1 activation, IMR-90 HDFs were incubated with the specific rac1 inhibitor NSC23766 (200 μ M; Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 1 h before incubation for 1 h with 10 ng/ml EGF (R&D Systems).

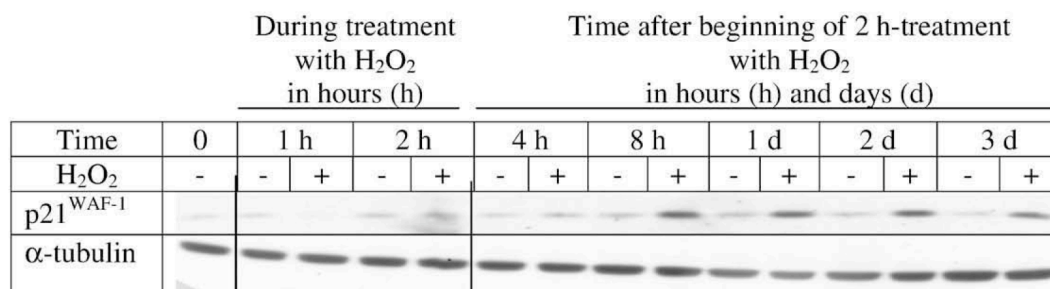
siRNA transfection

For invalidation of rac1 or cdc42, 21-nucleotide-long siRNAs were used (Table S.1B) [26]. The siRNA were chemically synthesized, desalted, deprotected, purified using PAGE, and annealed at 100 μ M (Eurogentec, Seraing, Belgium). For invalidation of p38 α ^{MAPK}, the siGENOME SMARTpool siRNA reagent M-003512-05 targeting p38 α ^{MAPK} from Dharmacon (Erembodegem, Belgium) was used. Nontargeting oligoribonucleotides (OR-0030-neg; Eurogentec) were used as negative control. IMR-90 HDFs were seeded at half-confluency (20×10^3 cells/cm²). One day later, the cells were transfected for 36 h (at day -3 before treatment with H₂O₂) with siRNA at 50 nM in MEM using Dharmafect transfection reagent (Fig. 1B). Cells were plated at day -1 before treatment with H₂O₂. For prelabeling of siRNA rac1, the Silencer siRNA Labeling Kit–FAM was used according to the manufacturer's protocol (Ambion, Austin, TX, USA).

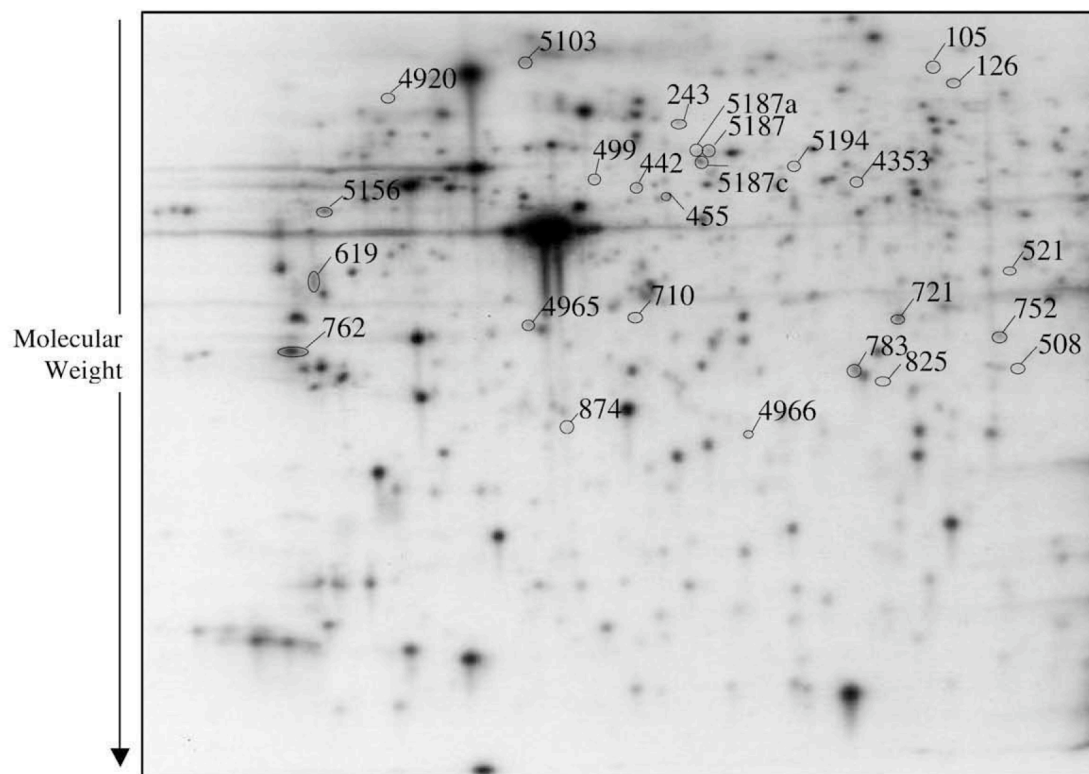
A p21^{WAF-1} mRNA abundance



B p21^{WAF-1} protein abundance



C pH 4 _____ Isoelectric point (IEF) _____ pH 7



Results

Induction of senescence-like phenotype with H₂O₂

IMR-90 HDFs were treated with five different experimental conditions (Fig. 1A). Cells were treated for 1 or 2 h with 150 μ M H₂O₂ (condition 1). The beginning of the treatment with H₂O₂ was defined as day 0. A 2-h treatment represented sublethal conditions as shown earlier [13]. Cells were incubated with TGF- β 1 for 72 h (condition 2). Cells were incubated or not with anti-TGF- β 1 antibodies (conditions 3 and 4). Cells were incubated with anti-TGF- β 1 antibodies starting at 12 h before treatment with H₂O₂ and continuing throughout the experiment (condition 5). New TGF- β 1 or anti-TGF- β 1 antibodies were provided every day for 3 days after day 0.

It was confirmed that treatment with H₂O₂ effectively led to a senescence-like phenotype. The proliferative potential of IMR-90 HDFs was estimated at 3 days after the sublethal 2-h treatment with H₂O₂ (150 μ M) by measuring [³H]thymidine incorporation into DNA. A sharp decrease in proliferative potential ($70 \pm 7\%$, $p < 0.001$) was observed at 3 days after treatment compared to control cells. The proportion of SA β -gal-positive cells reached $45 \pm 5\%$ ($p < 0.001$) at 3 days after treatment, representing a five-fold increase compared to control cells. From 8 h to 3 days after treatment with H₂O₂, p21^{WAF-1} mRNA abundance increased respectively by two-, seven-, nine-, and fivefold at 8 h, 1 day, 2 days, and 3 days after treatment with H₂O₂ (Fig. 2A). Moreover, p21^{WAF-1} protein abundance was increased from 8 h to 3 days after treatment with H₂O₂ (Fig. 2B). These results were in agreement with the literature [13].

2DGE analysis of de novo protein synthesis after H₂O₂ stress

Neosynthesized proteins were labeled from the second to the third day after treatment with H₂O₂ or from the second to the third day of stimulation with TGF- β 1. Extracts of labeled proteins were prepared from the five experimental conditions. Three independent experiments were performed. Thus 3 samples were collected for each of the five conditions. This represented a total of 15 samples to be analyzed with 2DGE. A total of 431 different spots were located on the gels. Statistical analysis revealed 28 spots with a significant twofold difference in integrated intensity (Fig. 2C and Tables 1A and B). Seventeen changes in intensity were found during establishment of the

H₂O₂-induced senescence-like phenotype, with only 1 spot with decreased intensity compared to the controls. Seven changes in intensity were found in TGF- β 1-stimulated HDFs, with only 1 spot more intense compared to the control HDFs. In the absence of H₂O₂, the incubation with anti-TGF- β 1 antibodies led to 4 significant changes compared to the control HDFs. TGF- β 1 is probably secreted at low levels in normal culture, which is likely to affect gene regulation through autocrine and/or paracrine mechanisms. No common change in spot intensity was found between the HDFs treated with H₂O₂ and the HDFs stimulated with TGF- β 1. It can be argued that the relatively low number of spots on 2DGE and relatively high cutoff value of the analysis fixed played against the detection and consideration of spots with common changes in intensity. Anyway, these results suggested that at least 17 proteins underwent differential metabolic labeling in HDFs in the senescence-like phenotype. These changes were independent of TGF- β 1, which supported the main hypothesis of this work. The next step was to identify the proteins corresponding to the spots pinpointed in this analytical step.

Protein identification by mass spectrometry

The proteins identified by mass spectrometry are listed in Tables 2A and B. Nearly every the spot corresponded to a single protein species. Only two spots yielded several proteins. Analysis in database was performed with data from MS (MALDI), with data from both MS and MS/MS (MALDI), as described [21], or with data from LC-MS/MS, and the score, matching peptides, and sequence coverage (%) are listed in Tables S.2A and S.2B. Details obtained with Mascot software are listed in Tables S.3 and S.4. Moreover, MALDI-TOF mass spectra are included in Table S.3 for protein identification performed only with MS data. Sequences of peptides used for identification by MS/MS are included in Tables S.3 and S.4. The differences in spot intensity can be due to two processes, the first of which is a change in neosynthesis. In addition, some of the protein species identified can also represent differential posttranslational modifications occurring after neosynthesis in the presence of [³⁵S] methionine, which can result in a modified intensity of spots corresponding to posttranslationally modified isoforms.

Among the nine proteins which neosynthesis changed after stimulation with TGF- β 1, eight appeared less metabolically labeled. Only osteonectin was more metabolically labeled (spot

Fig. 2. Effects of treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ at 150 μ M for 2 h on p21^{WAF-1} mRNA abundance and p21^{WAF-1} protein abundance. (A) p21^{WAF-1} mRNA abundance at increasing times after treatment with H₂O₂. The abundance of GAPDH mRNA was used as reference in the real-time RT-PCR analysis. The results are expressed in percentages compared to control cells before the treatment and are given as means \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was carried out with the Student *t* test to compare the values with the control before the stress. NS, nonsignificant ($p > 0.05$); $^{**}0.01 > p > 0.001$. (B) p21^{WAF-1} protein abundance at increasing times after treatment with H₂O₂. α -Tubulin protein abundance was used as reference in Western blot. Analyses were performed on three independent experiments and the results presented are representative of triplicates. (C) Typical 2DGE image obtained from IMR-90 HDFs after metabolic labeling of proteins with [³⁵S]methionine. At 1 day after seeding, IMR-90 HDFs were (1) exposed to 150 μ M H₂O₂ for 2 h, rinsed, and provided new medium; (2) stimulated with 10 ng/ml TGF- β 1 for 3 days; or (3) incubated with anti-TGF- β 1 antibodies (3 μ g/ml) from 12 h before the treatment with H₂O₂ until 3 days after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂. Controls incubated with anti-TGF- β 1 or not were also included (4 and 5). At day 2 after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂, IMR-90 HDFs from each condition were incubated with [³⁵S]methionine for 1 day. 2DGE was performed using a pH range of 4–7 in the first dimension and SDS–PAGE (4–12%) in the second dimension. 431 spots were located on each gel. Circles and numbers on the 2D image of control fibroblasts indicate the spots with an intensity change under one condition compared to another. The variations and names of the identified proteins are given in Tables 1 and 2.

Table 1

Spot No.	Variation of spot intensity (<i>p</i> values)				
	H ₂ O ₂ /Ctrl	H ₂ O ₂ + ab/Ctrl	TGF-β1/Ctrl	H ₂ O ₂ + ab/Ctrl + ab	Ctrl + ab/Ctrl
<i>(A) Ratios ≥ 2 (twofold increase)</i>					
1	105			5.4 (0.05)	
2	126			5.2 (0.05)	
3	243			2.8 (0.05)	
4	710	2.7 (0.05)	3.0 (0.01)		
5	721	2.2 (0.04)			
6	752			3.1 (0.03)	
7	783			2.5 (0.4)	
8	825	4.0 (0.05)			
9	874		2.6 (0.02)	2.2 (0.04)	
10	4353			2.6 (0.02)	
11	4920				3.5 (0.02)
12	4965	2.9 (0.02)			2.6 (0.05)
13	4966				2.4 (0.03)
14	4997			2.2 (0.05)	
15	5087	3.3 (0.02)			2.4 (0.04)
16	5217	4.2 (0.01)			
17	619		2.9 (0.01)		
<i>(B) Ratios ≤ 2 (50% decrease)</i>					
18	5103	−2.8 (0.04)			
19	442		−2.9 (0.05)		
20	455		−2.0 (0.02)		
21	762		−2.4 (0.05)		
22	5156		−2.3 (0.05)		
23	5187 a + b + c		−2.0 (0.05)		
24	5194		−2.0 (0.03)		

Spot number, significant variations in spot intensity, and *p* values (in parentheses) are given for conditions compared two by two.

619). The proteins identified as undergoing a decrease in metabolic labeling after stimulation with TGF-β1 are briefly described in the supplementary material available online.

The main goal of this study was to search for TGF-β1-independent effectors playing a role in the establishment/maintenance of the H₂O₂-induced senescence-like phenotype. The proteins identified in this category included a series of cytoskeleton-, heat shock-, and metabolism-related proteins, as well as proteasome subunits and proteins involved in protein degradation and in signal transduction induced by stress and transcription (Table 2). Let us focus on β-actin, ezrin, caldesmon (CaD), cdc42-GAP, T-plastin, and HSP27, given their possible involvement in morphogenesis. The literature evidence that these proteins play a role in morphogenesis is described in the supplementary material. β-Actin (spot 710) was increased by 2.7-fold and corresponded to an isoform of actin lighter than the native form. The latter corresponded to a much larger spot on the 2DGE (Fig. 2C). A 5.4-fold increase in spot intensity corresponding to ezrin (spot 105) was found in the H₂O₂-induced senescence-like phenotype. The intensity of the spot corresponding to CaD (spot 126) was increased by 5.2-fold in the senescence-like phenotype. Spot 243 (2.8-fold increase in spot intensity in the senescence-like phenotype) corresponded to the T isoform of plastin. The intensity of the spot corresponding to cdc42-GTPase-activating protein (cdc42-GAP) underwent a 2.6-fold increase under the condition “H₂O₂ + anti-TGF-β1 antibodies” compared to the condition “control + anti-TGF-β1 antibodies” (spot 4353). HSP27 was identified in two different

mixes of proteins (spots 783 and 825). The other proteins for which the corresponding spot was more intense in the senescence-like phenotype independent of TGF-β1 are briefly described in the supplementary material available online.

Study of proteins of interest involved in morphogenesis

A large decrease in the abundance of the mRNA of L-CaD, ezrin, cdc42-GAP, and T-plastin was observed at 4 h after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂. The abundance of L-CaD and T-plastin mRNA was still very low at 8 h after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂. At 2 and 3 days after the treatment, the abundance of all the mRNA species studied was similar in the treated and control cells (Fig. 3).

The total protein abundance of ezrin, L-CaD, and HSP27 was estimated by Western blot. No specific antibody was available for detecting cdc42-GAP or T-plastin by Western blot. Western blots were performed from cells obtained in three independent experiments. Each experiment gave similar results (Fig. 4A). The protein abundance of ezrin, L-CaD, and HSP27 was similar in the treated and untreated cells after 1 and 2 h of treatment with H₂O₂ and at 4 h, 8 h, 1 day, 2 days, and 3 days after the beginning of the 2-h treatment.

Ezrin, L-CaD, and HSP27 can be phosphorylated. The phosphorylated isoforms could have been identified in this study as spots with increased intensity. Western blots showed that phosphorylated L-CaD was more abundant after 1 and 2 h of treatment with H₂O₂ and from 3 to 5 days after treatment with H₂O₂

Table 2

Spot No.	Identification	Accession No.	Molecular weight	pI	Main known function	
(A) Increased intensity (spots with ratio ≥ 2 (twofold increase))						
1	105	Ezrin	AAH68458	69,199	5.94	Cytoskeleton regulation
2	126	Caldesmon	NP_149130	64,218	6.66	Cytoskeleton regulation
3	243	Plastin T isoform	NP_005023	71,279	5.41	Cytoskeleton regulation
4	710	β-Actin	AAH12854	40,536	5.55	Structural constituent of cytoskeleton
5	721	26S proteasome-associated pad1 homolog	NP_005796	34,555	6.06	Protein degradation
6	752	Proteasome α1 subunit	NP_002777	29,822	6.15	Protein degradation
7	783	Mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor + Heat shock protein 27	NP_004083+P04792	31,807+22,783	8.34+7.83	Metabolism + Stress response
8	825	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase + Heat shock protein 27	NP_060599+P04792	30,311+22,783	6.62+7.83	Metabolism + Stress response
9	874	Vacuolar protein sorting 28	NP_057292	25,694	5.37	Endosomal transport
10	4353	cdc42 GTPase-activating protein	NP_004299	50,461	5.85	Cytoskeleton regulation
11	4920	Vimentin	A25074	53,619	5.06	Cytoskeleton regulation
12	4965	Napsin A	AAH01165	33,211	5.23	Processing of pneumocyte surfactant precursors
13	4966	Proteasome 26S non-ATPase subunit 10	NP_002805	24,697	5.71	Protein degradation
14	4997	BAF complex 53-kDa subunit	NP_817126	43,665	5.78	Chromatin binding
15	5087	Phosphoglycerate mutase	NP_002620	28,786	6.67	Metabolism
16	5217	Poly(rC) binding protein	Q15366	38,955	6.33	Single-stranded nucleic acid binding protein
17	619	Osteonectin	NP_003109	35,465	4.73	Extracellular matrix binding calcium ion and collagen
(B) Decreased intensity (spots with ratio ≤ 2 (50% decrease))						
18	5103	Proteasome α1 subunit	AAH05932	29864	6.15	Protein degradation
19	442	HLA-B-associated transcript 1	NP_004631	49416	5.44	ATP-dependent helicase activity
20	455	HLA-B-associated transcript 1	NP_004631	48960	5.44	ATP-dependent helicase activity
21	762	14-3-3σ	NP_006752	29326	4.63	Signal transduction
22	5156	Ribonuclease/angiogenin inhibitor	NP_002930	51766	4.71	Inhibitor of pancreatic RNase and angiogenin
23	5187a	Protein disulfide isomerase ER-60	AAC51518	57147	5.88	Protein degradation
23	5187b	Protein disulfide isomerase ER-60	AAC51518	57043	6.10	Protein degradation
23	5187c	Vacuolar H ⁺ -ATPase 56000 subunit	AAH30640	56735	5.66	Metabolism
24	5194	Aldehyde dehydrogenase	AAB59500	54394	5.70	Metabolism

List of proteins identified in the proteome analysis comparing IMR-90 fibroblasts in H₂O₂-induced senescence-like phenotype or after stimulation with TGF- β 1. Spot number, accession number, theoretical molecular weight, and theoretical isoelectric point (pI), as well as main known function, are given.

(Figs. 4A and B). Western blots also revealed that the abundance of HSP27 phosphorylated on serine 82 greatly increased after 1 and 2 h of treatment with H₂O₂ and at 4 and 8 h after the beginning of a 2-h treatment with H₂O₂ (Fig. 4A). Phospho-ezrin and phospho-ERM could not be detected in lysates of IMR-90 HDFs despite two different antibodies being tested.

The increased spot intensity observed on the 2DGE did not correspond to increased mRNA or total protein abundance for any of these proteins of interest. Only the phosphorylation profile of L-CaD could explain the detection of a CaD spot with increased intensity if L-CaD was phosphorylated after neosynthesis. Another hypothesis was that the changes observed on 2DGE for ezrin, CaD, and HSP27 corresponded to concomitant increased neosynthesis and increased degradation of these spots.

Neosynthesis of ezrin, L-CaD, and HSP27 after treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂

The abundance of ezrin, L-CaD, and HSP27 was estimated at 72 h after treatment with H₂O₂ with or without the inhibitor of protein translation CXM added between day 2 and day 3 after a 2-h treatment with H₂O₂ at 150 μ M. This timing corresponded

to the conditions of metabolic labeling with [³⁵S]methionine used above and was used thereafter.

The effects of CXM on IMR-90 HDF numbers were tested (Fig. S.1). Under these conditions, CXM at 2 and 10 μ g/ml rapidly prevented the induction of expression of p21^{WAF-1} after treatment with H₂O₂ (Fig. 5A). This indicated that CXM effectively inhibited protein translation. Analysis by Western blot revealed that the protein abundance of ezrin, L-CaD, and HSP27 was decreased at 3 days after treatment with H₂O₂ and incubation with CXM at 2 or 10 μ g/ml, compared to the cells treated with H₂O₂ and not incubated with CXM (Fig. 5A). This spoke in favor of increased neosynthesis of these proteins after treatment with H₂O₂. However, incubation of IMR-90 HDFs with CXM did not completely abrogate the presence of ezrin, L-CaD, and HSP27, whereas p21^{WAF-1} disappeared totally (Figs. 5B and C). A possible explanation was that the life spans of ezrin, L-CaD, and HSP27 are longer than 1 day. To test this hypothesis CXM at 10 or 2 μ g/ml was used for incubations respectively shorter or longer than 3 days (Fig. 5C). The abundance of HSP27 started to decrease after 3 days of incubation with CXM. A slight decrease in the abundance of L-CaD was observed after 4 days of incubation. The abundance of ezrin remained stable for at least

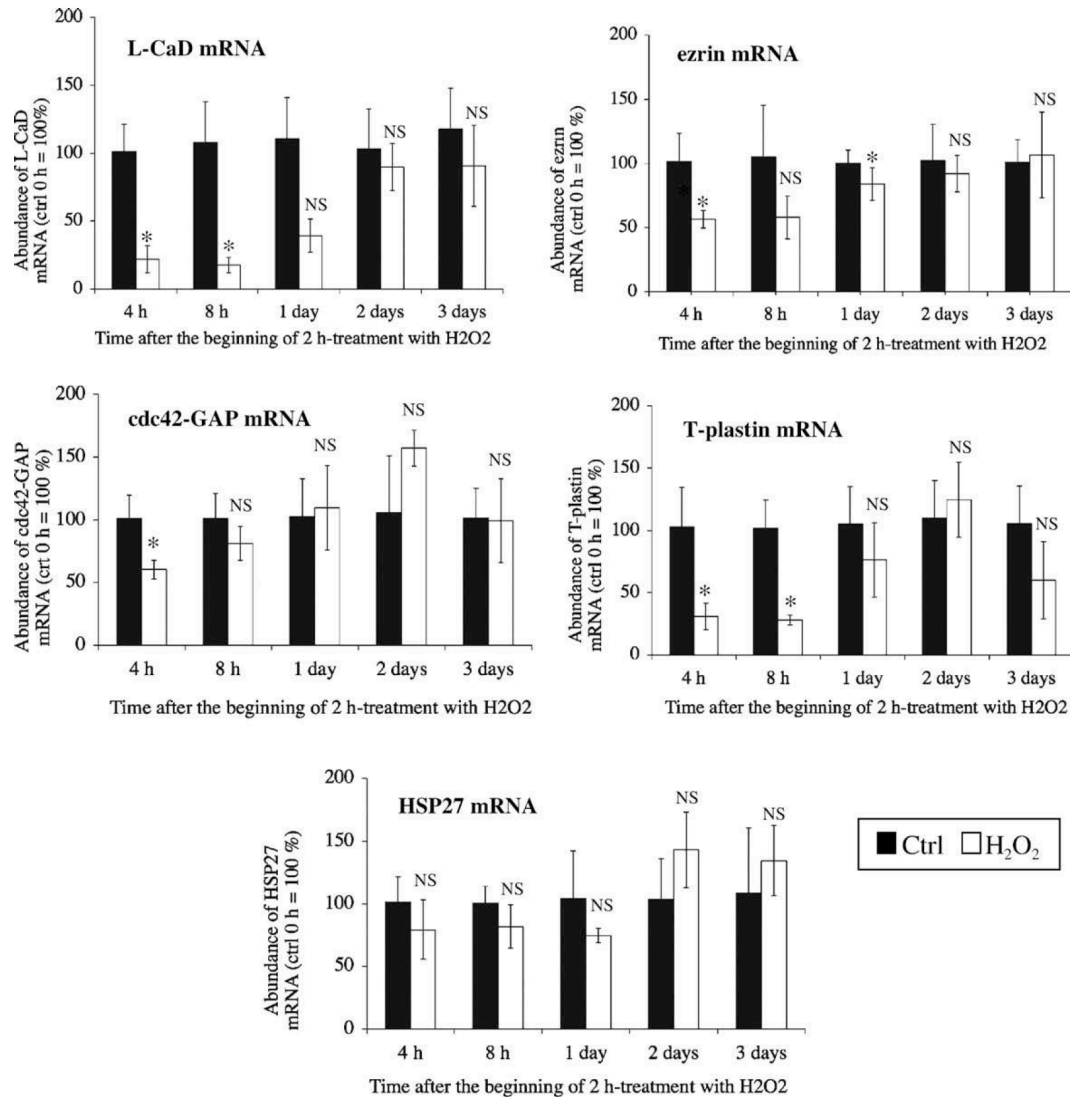


Fig. 3. Effects of H₂O₂ on the abundance of L-CaD, ezrin, cdc42-GAP, T-plastin, and HSP27 mRNA in IMR-90 HDFs. IMR-90 HDFs were treated with H₂O₂ at 150 μ M for 2 h. Total RNA was extracted at 4 h, 8 h, 1 day, 2 days, and 3 days after the beginning of 2-h treatment with H₂O₂. The abundance of GAPDH mRNA was used as reference in the real-time RT-PCR analysis. The results are expressed in percentages compared to control cells before the stress and are given as means \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was carried out with the Student *t* test to compare the values with the control before the treatment with H₂O₂. NS, nonsignificant ($p > 0.05$); * $0.05 > p > 0.01$.

5 days of incubation with CXM (Fig. 5C). Thus, HSP27, ezrin, and L-CaD were indeed neosynthesized more between day 2 and day 3 after treatment with H₂O₂. Now, it can be understood why the total abundance of these proteins did not seem to change: their neosynthesis was probably compensated for by concomitant degradation.

Effect of treatment with H₂O₂ on activation of rac1/cdc42 in IMR-90 HDFs

Increased intensity of a spot corresponding to cdc42-GAP was found on the 2DGE. This protein can inhibit rac1 and/or cdc42 Rho proteins. Thus, we performed a GTPase assay for rac1 and cdc42 at different times after 2 h of treatment with

H₂O₂, in three independent experiments. Each experiment gave very similar results. We treated IMR-90 HDFs with 0.1 μ M bradykinin and 10 ng/ml EGF as positive controls for activating respectively cdc42 or rac1. We used the chemical inhibitor of rac1, NSC23766, at 200 μ M, as a negative control for rac1 activity. The total abundance of cdc42 and rac1 did not change until 3 days after treatment with H₂O₂. Cdc42-GTP was more abundant after 1 h of treatment with H₂O₂, whereas rac1-GTP abundance was decreased (Fig. 5D). Cdc42-GTP was more abundant at 1 day after the treatment with H₂O₂ and rac1-GTP increased at 1, 2, and 3 days after 2 h of treatment with H₂O₂ compared to untreated cells (Fig. 5E). Thus the activation of cdc42 and rac1 was not synchronized after treatment with H₂O₂ except at day 1 after treatment. Thus, it seems unlikely that

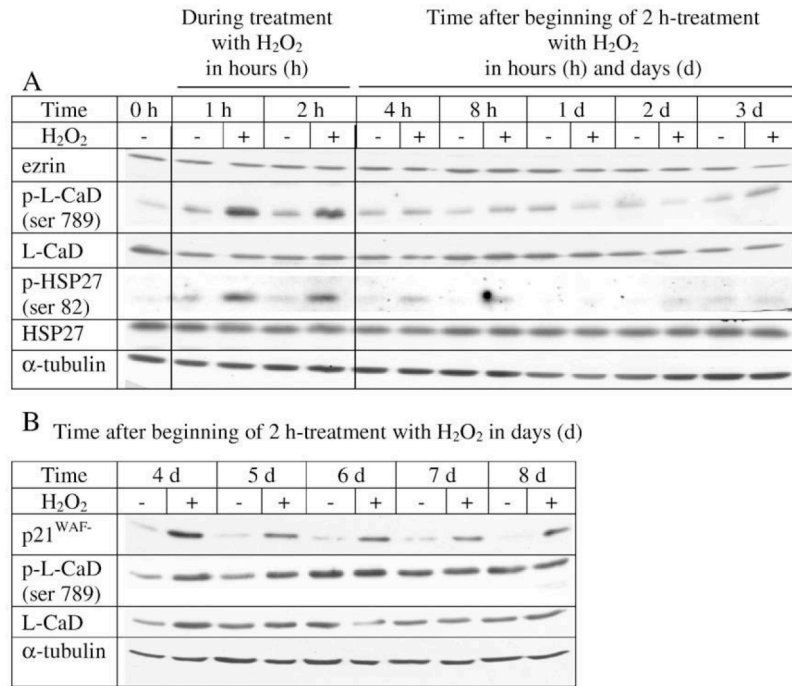


Fig. 4. (A) Protein abundance of ezrin, phospho-L-CaD, total L-CaD, phospho-HSP27, and total HSP27 in IMR-90 HDFs before any treatment with H₂O₂ (0 h), after a 1- or 2-h treatment with H₂O₂, and at 4 h, 8 h, and 1 to 3 days after the beginning of a 2-h treatment with H₂O₂. α-Tubulin protein abundance was used as reference in the Western blot. Analyses were performed in three independent experiments and images are representative results of triplicates. (B) Protein abundance of phospho-L-CaD, total L-CaD, and p21^{WAF-1} in IMR-90 HDFs at 4 to 8 days after the beginning of a 2-h treatment with H₂O₂. p21^{WAF-1} and α-tubulin protein abundances were used respectively as positive control for the treatment with H₂O₂ and as reference in the Western blot. Analyses were performed in three independent experiments and images are representative results of triplicates.

increased neosynthesis of cdc42-GAP alone can explain these results. Activation of cdc42 after 1 h treatment with H₂O₂ and at 1 day after cell treatment (stress, stimulation) had never been reported before. The same holds true for activation of rac1 from 1 to 3 days after treatment. This made it likely that these proteins can play a role in senescence-like morphogenesis after treatment with H₂O₂.

In addition, p38^{MAPK} is known to be involved in rho protein-induced signaling [27,28]. Phosphorylation of p38^{MAPK} was observed after 1 and 2 h of treatment with H₂O₂ and until 4 h after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂ (Fig. 5F). Taken together, these results suggest that cdc42, rac1, and p38^{MAPK} could play a role in senescence-like morphogenesis. To test this hypothesis, cdc42, rac1, and p38^{MAPK} expression was invalidated using siRNA. The experimental settings for invalidation with siRNA are described in Fig. 1B and optimization of the experimental conditions is described in the supplementary material available online (Figs. S.2 and S.3).

Effect of cdc42, rac1, or p38^{MAPK} invalidation on the proliferation rate of IMR-90 HDFs after treatment with H₂O₂

The proliferative rate of IMR-90 HDFs was analyzed between the second and the third day after treatment with H₂O₂ because the arrest of DNA synthesis at this time is a known marker of the stress-induced senescence-like phenotype. Despite the cells transfected with siRNA for rac1, cdc42, or p38^{MAPK}

being markedly less proliferative even in the absence of treatment with H₂O₂, the ratio between the cells exposed to H₂O₂ and those not exposed was much lower, respectively 0.007 ± 0.004 , 0.030 ± 0.002 , and 0.100 ± 0.09 in cells transfected with cdc42, rac1, and p38^{MAPK}, compared to the ratio between cells exposed to H₂O₂ and those not exposed and transfected with negative siRNA (0.200 ± 0.05) (Table 3).

Effect of cdc42, rac1, or p38^{MAPK} invalidation on senescence-like morphology induced by H₂O₂

A senescence-like morphology is observed in IMR-90 HDFs at 3 days after treatment with H₂O₂ at sublethal concentration [11,13]. In fibroblasts, the small GTPases rac1 and cdc42 regulate the formation of lamellipodia and filopodia, respectively [29]. These are dynamic and often transient membranous structures on the surface of cells that can be observed in spreading, moving, and dividing cells. Lamellipodia are flat and wide and filopodia are shaped more like fingers that extend from the cells. Deroanne et al. already demonstrated in normal human skin fibroblasts that ablation of rac1 with siRNA decreased lamellipodium formation and ablation of cdc42 with siRNA induced a more “dendritic” morphology [26]. Under similar conditions, we found that invalidation of rac1 induced a thinner morphology of IMR-90 HDFs with edges that became refringent (Fig. 6A). Cells in which cdc42 was invalidated displayed a more “dendritic” morphology with reduced cytoplasmic surface. After p38^{MAPK} invalidation,

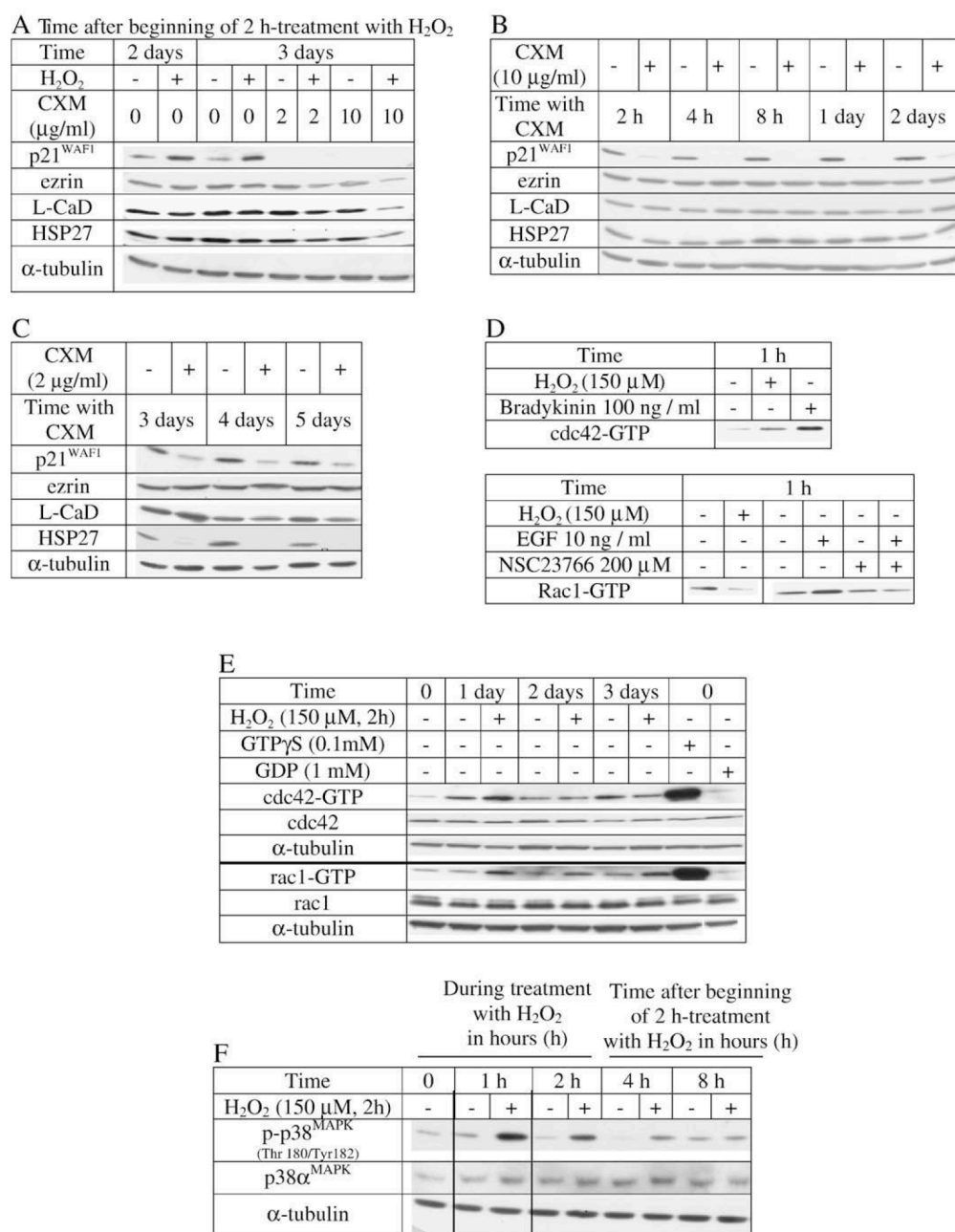


Fig. 5. (A) Effects of CXM on p21^{WAF1}, ezrin, L-CaD, and HSP27 protein abundance in IMR-90 HDF controls or after treatment with H₂O₂ at 150 μM for 2 h. At day 2 after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂, IMR-90 HDFs were incubated with CXM (2 or 10 μg/ml) for 1 day. Proteins were extracted at 2 or 3 days after the beginning of the 2-h treatment with H₂O₂. α-Tubulin protein abundance was used as reference in the Western blot. Analyses were performed in three independent experiments and images are representative results of triplicates. (B, C) Estimation of p21^{WAF1}, ezrin, L-CaD, and HSP27 life span in IMR-90 HDFs. IMR-90 HDFs were incubated with CXM for increasing durations (B, 2 h to 2 days with 10 μg/ml CXM; C, 3 to 5 days with 2 μg/ml CXM). α-Tubulin protein abundance was used as reference in the Western blot. Analyses were performed in three independent experiments and images are representative results of triplicates. (D, E, F) Effects of a 2-h treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ on rac1, cdc42, and p38^{MAPK} activation. Proteins were extracted at (D) 1 h or (E) 1, 2, and 3 days after the beginning of a 2-h treatment with H₂O₂. GTP-bound forms of rac1 or cdc42 were purified with GST-pak1-PBD fusion protein. Extracts were analyzed by Western blot. Rac1 and cdc42 activity was determined by the amount of GST-pak1-PBD (rac1-GTP and cdc42-GTP) normalized to total rac1 and cdc42 presented in whole-cell lysates. For positive control of cdc42 activity, IMR-90 HDFs were incubated with 100 ng/ml bradykinin for 1 h before protein extraction and analysis. For positive control of rac1 activity, IMR-90 HDFs were incubated with 10 ng/ml EGF for 1 h before protein extraction and analysis. For negative control of rac1 activity, IMR-90 HDFs were preincubated 1 h with a rac1 inhibitor (NSC 23766) at 200 μM and then incubated with 10 ng/ml EGF with NSC 23766 for 1 h before protein extraction and analysis. Positive and negative controls for pull-down assays were performed by adding GTPγS (0.1 mM) or GDP (1 mM), respectively, in whole-cell lysates before purification and analysis. Analyses were performed in three independent experiments and images are representative results of triplicates. (F) p38^{MAPK} and phospho-p38^{MAPK} protein abundance at increasing times during and after the treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂. α-Tubulin protein abundance was used as reference in the Western blot analysis. Analyses were performed in three independent experiments and the images presented are representative results of triplicates.

Table 3

Effects of *rac1*, *cdc42*, and $p38\alpha^{MAPK}$ invalidation with siRNA on the proliferative potential of IMR-90 HDFs treated with H_2O_2 or not

siRNA	Ratio H_2O_2 /control cells	<i>p</i> value
Negative	0.200±0.05	
Rac1	0.007±0.004	1.5×10^{-4}
Cdc42	0.030±0.002	1.6×10^{-4}
$p38\alpha^{MAPK}$	0.100±0.09	9.9×10^{-6}

Cells transfected with the indicated siRNA and incubated with Dharmafect or medium alone were treated with H_2O_2 at 150 μ M for 2 h, and incorporation of [3 H] thymidine (1 μ Ci/ml) into the DNA was allowed between the second and the third day after the beginning of the 2-h treatment with H_2O_2 . Each condition with siRNA and H_2O_2 was compared with the control condition (no H_2O_2) with siRNA. The results are given as means±SD from three independent experiments. Statistical analysis was carried out with the Student *t* test. Differences in proliferative potential between both conditions and *p* values are given.

the cell morphology looked similar to the morphology obtained after *rac1* invalidation.

At day 3 after treatment with H_2O_2 , IMR-90 HDFs under normal conditions transfected with negative siRNA or incubated with Dharmafect presented a more flattened shape. When *rac1*, *cdc42*, or $p38\alpha^{MAPK}$ was invalidated, no senescence-like morphology could be observed after treatment with H_2O_2 . The data with $p38\alpha^{MAPK}$ confirmed previous data obtained with chemical inhibition of $p38^{MAPK}$ with SB203580 or with antisense oligonucleotides [6].

Previous studies showed a correlation between induction of senescence-like morphology after treatment with H_2O_2 in IMR-90 HDFs, enhancement of actin stress fibers, and random/ sporadic distribution of vinculin and paxillin throughout these treated cells [14]. Similar results were obtained herein after treatment with H_2O_2 (Fig. 6B): actin and paxillin showed increased labeling intensity with more stress fibers (actin) and more intense focal adhesion plaques possessing paxillin at 3 days after treatment with H_2O_2 .

The cells transfected with *cdc42* siRNA displayed strong actin labeling on the edges of filopodia. At 3 days after treatment with H_2O_2 , the cells with invalidated *rac1*, *cdc42*, or $p38\alpha^{MAPK}$ displayed similar actin patterns compared to their untreated counterparts.

As for the paxillin pattern, the cells with invalidated *cdc42* or *rac1* displayed less intense paxillin foci after treatment with H_2O_2 . When $p38\alpha^{MAPK}$ was invalidated, the cells displayed more intense paxillin even in absence of H_2O_2 . This intensity was again reinforced after treatment with H_2O_2 .

Effect of rac1, cdc42, or p38 α^{MAPK} on phospho-HSP27 and phospho-L-CaD

It was tested whether *cdc42*, *rac1*, or $p38\alpha^{MAPK}$ can play a role in the phosphorylation of HSP27 and L-CaD (Fig. 7). After 1 h of treatment with H_2O_2 , *cdc42* siRNA decreased the abundance of phosphorylated $p38^{MAPK}$ and phosphorylated HSP27. $p38\alpha^{MAPK}$ siRNA decreased the abundance of phosphorylated HSP27 and *cdc42*-GTP. This regulation is not mediated by direct interaction because immunoprecipitation of $p38\alpha^{MAPK}$

does not coprecipitate *cdc42* (data not shown). *Cdc42* and $p38\alpha^{MAPK}$ siRNA respectively did not affect or decreased the abundance of phosphorylated L-CaD after 1 h of treatment with H_2O_2 and at 4 days after treatment with H_2O_2 . Thus, the phosphorylation of L-CaD during treatment with H_2O_2 does not seem to be controlled by $p38\alpha^{MAPK}$ nor by *cdc42*. Studies on other cell types concluded that ERK MAP kinase is responsible for the early phosphorylation of CaD, whereas $p38^{MAPK}$ -dependent phosphorylation takes place thereafter [30]. However, the phosphorylation level of L-CaD was not reduced by inhibiting ERK with the specific chemical inhibitor U0126 during treatment with H_2O_2 (data not shown). The phosphorylation of L-CaD observed at day 4 after treatment with H_2O_2 is dependent on $p38\alpha^{MAPK}$ and *cdc42*.

Rac1 siRNA did not present a marked effect on phosphorylation of L-CaD.

As positive control for the response to H_2O_2 , the abundance of $p21^{WAF-1}$ was still sharply induced at 4 days after treatment with H_2O_2 [13].

Transfection reagent alone ($\pm H_2O_2$) and negative siRNA ($\pm H_2O_2$) gave results similar to those obtained with culture medium alone (respectively $\pm H_2O_2$).

Effect of rac1, cdc42, or p38 α^{MAPK} siRNA on TGF- β 1 mRNA abundance

It was found previously that $p38^{MAPK}$ is responsible for the induction of TGF- β 1 after treatment of IMR-90 HDFs with H_2O_2 . $p38\alpha^{MAPK}$ and *cdc42* siRNA reduced the induction of TGF- β 1 respectively 2.5 ± 0.2 , 2.2 ± 0.5 , and 2.2 ± 0.1 after H_2O_2 treatment for control cells, cell treatment with transfected reagent, and cells transfected with negative siRNA, to a respective 1.6 ± 0.3 -fold and nonsignificant 1.2 ± 0.1 -fold increase. *Rac1* siRNA did not alter the induction of TGF- β 1 (2.1 ± 0.3).

Discussion

The aim of this work was to search for proteins undergoing TGF- β 1-independent changes in abundance in the H_2O_2 -induced senescence-like phenotype of IMR-90 HDFs. We performed a proteomic study based on metabolic labeling of proteins after treatment of the cells with a sublethal concentration of H_2O_2 , in the presence of neutralizing antibodies against TGF- β 1 or not. Previous studies showed that metabolic labeling is a sensitive technical approach, making it possible to obtain valuable results compared with other types of protein labeling. We pinpointed 17 TGF- β 1-independent changes in H_2O_2 -treated IMR-90 HDFs and 7 changes in IMR-90 HDFs stimulated with TGF- β 1. Thus establishment of the H_2O_2 -induced senescence-like phenotype does not depend only on TGF- β 1 (Fig. 8).

Only the osteonectin was more metabolically labeled after stimulation with TGF- β 1. Osteonectin is associated with the extracellular matrix. It elicits changes in cell shape, inhibits cell-cycle progression, and influences the synthesis of the extracellular matrix [31]. The abundance of osteonectin mRNA is increased in IMR-90 HDFs stimulated with TGF- β 1 [13]. TGF- β 1 is involved in the morphological changes taking place in the γ -radiation-

induced growth arrest of fibroblasts [32]. Using antibodies neutralizing TGF- β 1, it was shown that TGF- β 1 controls the establishment of several biomarkers of the cellular senescence-like phenotype, including increased abundance of osteonectin mRNA,

after treatment of IMR-90 HDFs with a sublethal concentration of H₂O₂. An increased abundance of osteonectin mRNA was also described in models of stress-induced senescence-like phenotype using other agents as diverse as *t*-BHP, UVB, and ethanol [15,16].

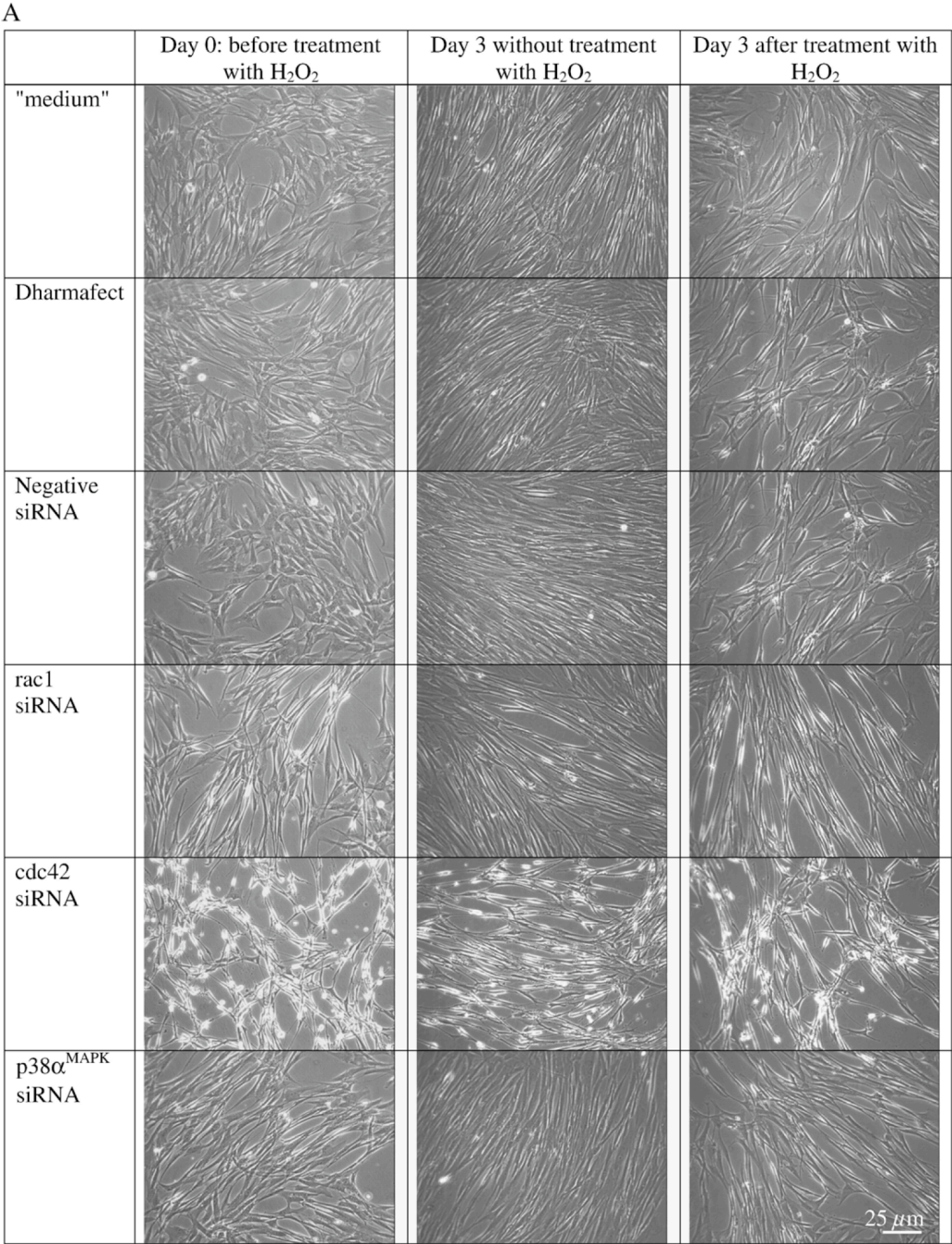


Fig. 6. (A) Effect of rac1, cdc42, or p38 α ^{MAPK} invalidation with siRNA on morphology of IMR-90 HDFs before treatment with H₂O₂ (day 0) and at day 3 after the beginning of 2-h treatment with H₂O₂ or not. IMR-90 HDFs were transfected with the indicated siRNA and incubated with Dharmafect or with medium alone ("medium") for 36 h. Representative micrographs of IMR-90 HDFs in phase-contrast microscopy are shown at day 0 (before H₂O₂) and at day 3 after treatment with H₂O₂. (B) Effect of rac1, cdc42, or p38 α ^{MAPK} invalidation with siRNA on actin and paxillin organization after treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂. IMR-90 HDFs were transfected with the indicated siRNA or incubated with medium alone ("medium") for 36 h before treatment with H₂O₂. At day 3 after the transfection, the cells were treated with H₂O₂ at 150 μ M for 2 h. At day 3 after the treatment with H₂O₂, the cells were seeded on cover glasses at 20,000 cells/cm² and fixed at day 4. β -Actin was stained by phalloidin. Paxillin was immunolabeled using specific primary antibodies and secondary antibodies conjugated to Alexa fluorochrome. Representative fluorescence micrographs were obtained by semiquantitative confocal microscopy.

B

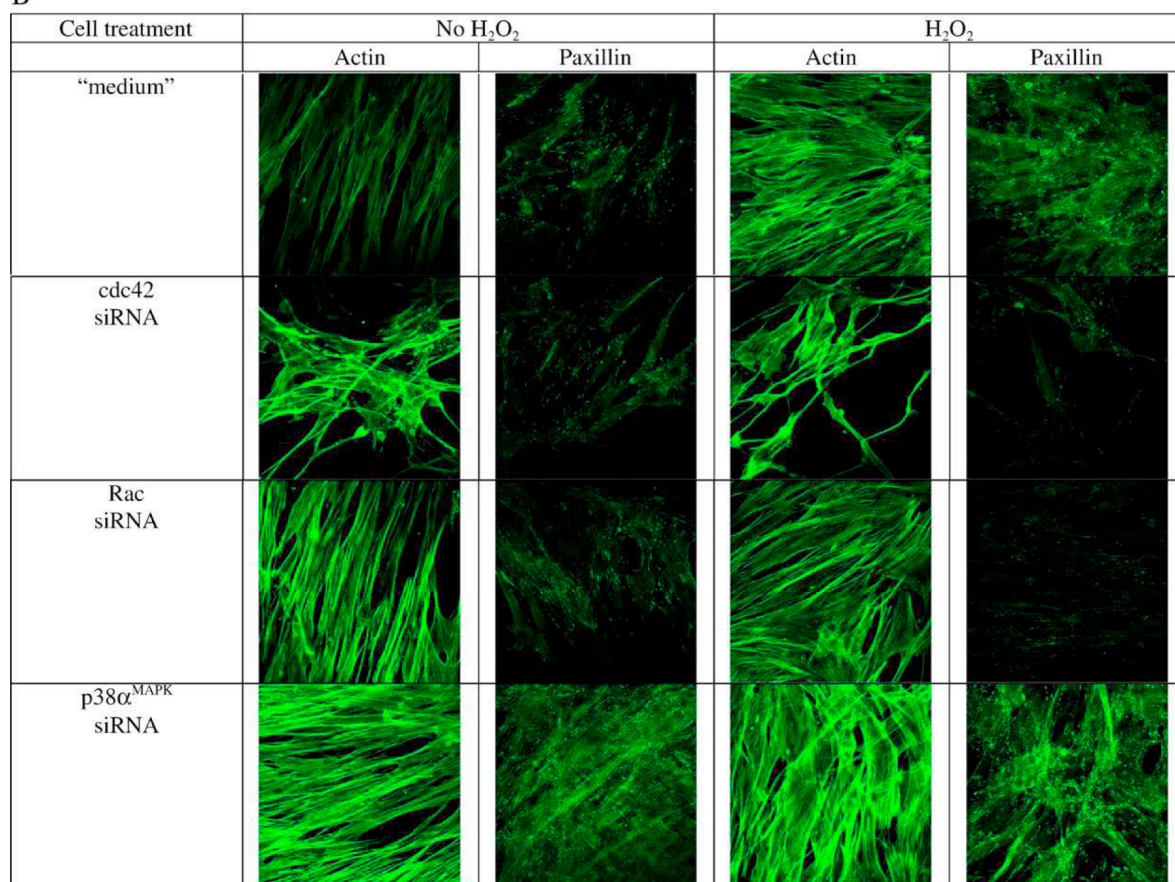


Fig. 6 (continued).

However, an increase in osteonectin protein abundance in the H₂O₂-induced senescence-like phenotype has not been described.

β-Actin, ezrin, L-CaD, and HSP27 were among proteins which present changed neosynthesis, independent of TGF-β1, between day 2 and day 3 after treatment with H₂O₂. It is likely that cleavage of actin resulting in fragments was increased in the stress-induced senescence-like phenotype, resulting in an increase in the size of the spot corresponding to this fragment of actin. Enlarged fibers of actin are typically observed in the senescence-like phenotype of HDFs [14].

The profile of phosphorylation of L-CaD suggested that a spot on 2DGE corresponding to separation of an isoform phosphorylated after neosynthesis has been detected.

Previous studies showed that transfection of fibroblasts with the full-length CaD cDNA resulted either in altered cell morphology and increased cell spreading or in decreased contractility, inhibition of stress fiber formation, and focal adhesion. Overexpression of the fully functional actin-binding C-terminal fragment of CaD also promotes cell spreading [33]. A study on vascular smooth muscle cells suggested differential roles of L-CaD in the modulation of podosome size and lifetime [34]. Podosomes have been identified as columnar arrays of actin filaments surrounding a narrow tubular invagination of the plasma membrane roughly perpendicular to the substratum. These intracellular adhesion structures are involved in the regulation of cell locomotion by

regulating the release of metalloproteinases in a large number of cell types [35–38]. Distinct molecular pathways involved in these processes have been described depending on the cell type considered, all involving rho GTPases [37].

CaD is considered one of the key regulators of actin dynamics and thereby cell polarity, membrane extension, and cell motility. We showed for the first time that L-CaD can be phosphorylated after treatment with H₂O₂. It is known that L-CaD phosphorylation alters the interaction of L-CaD with actin [39]. The kinases that can phosphorylate CaD in vitro include not only p38^{MAPK} but also ERK, pak1, cdk1, and protein kinase C [40]. These kinases represent potential candidates responsible for phosphorylation of L-CaD after treatment with H₂O₂. In addition, a study on smooth muscle contraction revealed that phospho-HSP27 can interact with phospho-CaD [41].

Other studies showed that ezrin is immediately neosynthesized as well as degraded by the proteasome after treatment with oxidative stress [42]. A first possible explanation of this regulation in the stress-induced senescence-like phenotype is that the turnover of proteins involved in cytoskeleton scaffolding like ezrin, L-CaD, and HSP27 represents a sensitive cellular sensor involved in spatial and temporal reorganization of the actin cytoskeleton observed after the oxidative stress. A second and complementary hypothesis is that after oxidative stress, cells simultaneously degrade and neosynthesize ezrin, L-CaD, and HSP27 in order to work with a

A After 1 h of treatment with H₂O₂

a. Effect of cdc42 siRNA on phospho-L-CaD, phospho-p38^{MAPK}, and phospho-HSP27

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
cdc42 siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
negative siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
cdc42								
p-L-CaD (ser 789)								
p-p38 ^{MAPK} (Thr 180/ Tyr 182)								
p-HSP27 (ser 82)								
α-tubulin								

b. Effect of p38α^{MAPK} siRNA on phospho-L-CaD, phospho-p38^{MAPK}, and phospho-HSP27

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
p38α ^{MAPK} siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
negative siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
p38α ^{MAPK}								
p-L-CaD (ser 789)								
p-HSP27 (ser 82)								
α-tubulin								

c. Effect of p38α^{MAPK} siRNA on total cdc42 and cdc42-GTP

H ₂ O ₂	-	+	-	+
p38α ^{MAPK} siRNA	-	-	+	+
p38α ^{MAPK}				
cdc42-GTP				
cdc42				
α-tubulin				

B Day 4 after treatment with H₂O₂

a. Effect of rac1 siRNA on phospho-L-CaD

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
rac1 siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
negative siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
rac1								
p-L-CaD (ser 789)								
p21 ^{WAF-1}								
α-tubulin								

b. Effect of cdc42 siRNA on phospho-L-CaD

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
cdc42 siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
negative siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
cdc42								
p-L-CaD (ser 789)								
p21 ^{WAF-1}								
α-tubulin								

c. Effect of p38α^{MAPK} siRNA on phospho-L-CaD

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
p38α ^{MAPK} siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
negative siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
p38α ^{MAPK}								
p-L-CaD (ser 789)								
p21 ^{WAF-1}								
α-tubulin								

Fig. 7. Effect of rac1, cdc42, or p38α^{MAPK} invalidation with siRNA on protein abundance of p38^{MAPK}, phospho-p38^{MAPK}, phospho-L-CaD, and phospho-HSP27 after treatment with H₂O₂. IMR-90 HDFs were transfected with the indicated siRNAs and incubated with Dharmafect or with medium alone. Proteins were extracted (A) after a 1-h treatment with H₂O₂ or (B) at day 4 after the beginning of a 2-h treatment with H₂O₂. p21^{WAF-1} protein abundance was estimated at day 4 as positive control for the treatment with H₂O₂. α-Tubulin protein abundance was used as a reference in the Western blot. Analyses were performed in three independent experiments and the results presented are representative of triplicates.

pool of unoxidized proteins, ensuring better regulation of the cytoskeleton. Indeed, it is known that protein oxidation is observed in the H₂O₂-induced senescence-like phenotype of IMR-90 HDFs [15] and that the cellular de novo production of H₂O₂ increases for at least 72 h after the initial stress [43].

The cdc42 GTPase-activating protein (or cdc42-GAP) expression can lead to inhibition of rac1 and cdc42 rho-GTPases by hydrolysis of their GTP into GDP [44]. The rho family (rho, rac1, and cdc42) has been shown to be involved in producing signals that affect the rearrangement of the actin cytoskeleton [45]. Activated cdc42 and rac1 induce, respectively, the formation of filopodia and lamellipodia [29]. It is known that expression of activated forms of rac1 or cdc42 activate p38^{MAPK} in COS-7 and HeLa cells [28]. The activation of cdc42 was synchronized with the phosphorylation of p38^{MAPK}, HSP27, and L-CaD during the treatment with H₂O₂, whereas rac1 was inactivated. H₂O₂ [6] or UVB [15] can induce the phosphorylation of p38^{MAPK}. Previous studies demonstrated that the immediate activation of p38^{MAPK} after treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ at sublethal concentration is independent of TGF-β1 and that inhibition of

p38^{MAPK} blocks the appearance of H₂O₂-induced senescence-like morphology during treatment of different cell lines with H₂O₂ [6]. p38^{MAPK} phosphorylates HSP27, which behaves as a phosphorylation-regulated filamentous actin-capping protein, capable of inhibiting actin polymerization in its nonphosphorylated form and releasing actin polymerization after its phosphorylation [30].

Specific invalidation of p38α^{MAPK}, rac1, or cdc42 by using a siRNA approach allowed us to clarify the possible links between these proteins and L-CaD during or after treatment with H₂O₂. We demonstrated that cdc42 is involved in the phosphorylation of p38^{MAPK} during treatment with H₂O₂ and vice versa, which was unknown. It was already observed that pak1, a potential mediator of cdc42 signaling, stimulates p38^{MAPK} activity in COS-7 fibroblasts [28]. Thus a similar mechanism might exist during treatment with H₂O₂. We showed that p38α^{MAPK} and cdc42 allowed the phosphorylation of HSP27. Although phospho-HSP27 becomes much less abundant after invalidation of p38α^{MAPK}, it is still observable at very low levels after invalidation of cdc42. A possible explanation is that cdc42 is not the only effector responsible for p38^{MAPK} activation, which seems reasonable.

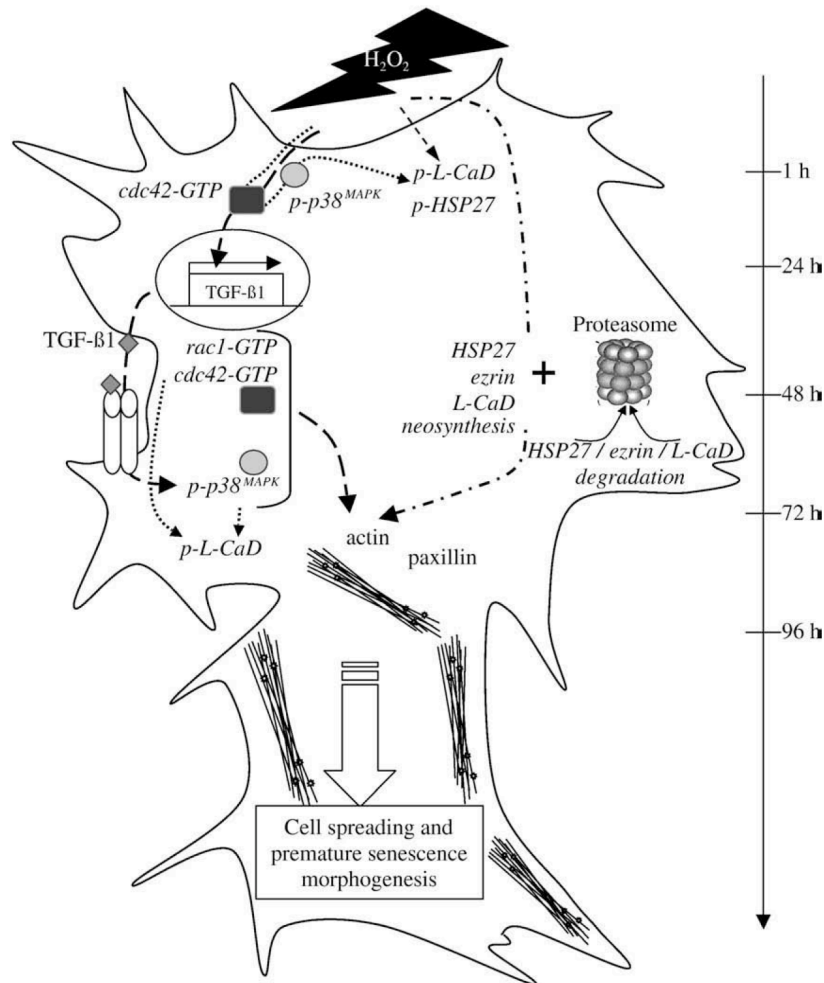


Fig. 8. Putative model depicting effects of H_2O_2 on IMR-90 HDF senescence-like morphogenesis. Rapid activation of *cdc42* and $p38^{MAPK}$ promotes phosphorylation of HSP27 and increased transcription of TGF- β 1. This in turn leads to the reactivation of $p38^{MAPK}$, which with *cdc42* allows phosphorylation of L-CaD as well as reorganization of the actin and paxillin cytoskeleton. On the other hand, H_2O_2 induces increased neosynthesis of ezrin, L-CaD, and HSP27, which are also thought to be involved in cytoskeleton reorganization.

Morphological changes are important features of cell senescence. Actin and focal adhesion, constituted essentially of vinculin and paxillin, build the framework of a cell [46]. The expression levels or spatial arrangement of these cytoskeleton proteins determine cell morphology [47,48]. $p38^{MAPK}$, *cdc42*, and *rac1* are known to regulate the functions of actin. Also it is well established that IMR-90 HDFs in the H_2O_2 -induced stress-induced senescence-like phenotype display a spread-out morphology. By investigating the role of these proteins in the appearance of this typical morphology, we showed that the appearance of this senescence-like morphology depends on $p38^{MAPK}$, *cdc42*, and *rac1* regulation of actin and paxillin organization.

The $p38^{MAPK}$ -induced increase in transcription and the increase in abundance of TGF- β 1 protein were previously shown to be partly necessary for H_2O_2 -induced morphogenesis, appearance of senescence-associated β -galactosidase activity, and overexpression of senescence-associated genes [13]. This study shows that *cdc42* is responsible for early phosphorylation of $p38^{MAPK}$ leading in turn to increased transcription of TGF- β 1. Thus, *cdc42* participates in the TGF- β 1-dependent changes ob-

served in the senescence-like phenotype. However, TGF- β 1-independent events are also shown herein to participate in senescence-like morphogenesis. Thus both TGF- β 1-dependent and -independent events participate in the senescence-like phenotype of HDFs induced by a sublethal concentration of H_2O_2 .

It was proposed that it could be possible to find culture conditions for each cell type that minimize stress (culture shock) and that leave telomere shortening as the only barrier to immortalization [4,49]. Narrowing the discussion to human diploid fibroblasts in vitro at physiological O_2 concentrations, 80 population doublings can be reached. If we consider two telomerase-negative fibroblasts that appear during in vivo embryogenesis, it would mean that at least 2^{80} fibroblasts ($>10^{24}$ fibroblasts) should be produced before the first replicatively senescent fibroblasts are seen (if 80 population doublings are necessary for the cells to become “truly” replicatively senescent, with critically short telomere). In addition, removal of any type of culture shock should increase this figure further to values slightly higher than 80. Considering the volume of a single fibroblast, 10^{24} fibroblasts represents a volume of several cubic

kilometers of fibroblasts. Even if the volume of a human could represent as much as 1 m³ of fibroblastic tissue subject to turnover, this would represent billions of possible turnovers, which is virtually impossible to reach within the present maximal human life span of 125 years. Of course asymmetric division processes should be considered, which would decrease these figures to some extent.

In vitro models of cells in stress-induced senescence-like phenotype have been generated. Historically authors, including ourselves, made the error of believing at first sight that cells in the stress-induced senescence-like phenotype were very similar to cells obtained after passaging at 20% O₂. Between 2 and 3 days after exposure of fibroblasts to oxidative stress, including H₂O₂ and *t*-BHP, one could indeed detect overexpression of “senescence-associated” genes like p21^{WAF-1}, fibronectin, osteonectin, SM22, apolipoprotein J, Mn-SOD, and α1(I)-procollagen. One could detect SA β-gal; the common deletion in mitochondrial DNA [10]; a decrease in *c-fos* mRNA level [50]; a decrease in AP-1 DNA-binding activity [6]; an overexpression of TGF-β1 [16], cyclin D1 [51], HSP27, pyruvate kinase [52], and cyclooxygenase-2 [53]; hypophosphorylated Rb [14]; increased *de novo* production of H₂O₂ [43]; DNA-binding activity of p53 (S. Zdanov and O. Toussaint, unpublished data); *cdc42* and *rac1* activation ([54] and this study); overexpression of caveolin-1 ([54] and A. Chrétien et al., unpublished observation); etc. Afterward, one started to realize, by comparing the proteomes [52,55] and the transcriptomes [16], that, beyond common mechanisms, cells obtained after passaging at 20% O₂ and exposure to sublethal oxidative stress also displayed differences in regard to gene expression. The long-term stress-specific changes have been termed “molecular scars” [56,57].

It was calculated that under 40% hyperoxia or after four treatments with *t*-BHP with a treatment at every two population doublings, compensatory cycling after stress was not sufficient to explain the observed telomere shortening, which was in favor of the existence of telomere shortening due to oxidative damage [58–60]. After a single exposure to H₂O₂ or five exposure to *t*-BHP within the same population doubling, telomere shortening due to oxidative DNA damage reached only 322±55 bp (H₂O₂) and 381±139 bp (*t*-BHP) [58]. On one hand, this confirmed that stress-induced senescence-like phenotypes can be observed even if the TRF shortening does not reach a minimal critical size of around 5 kb. On the other hand, this also suggested the possibility that limited telomere shortening could accumulate slowly within the life span of individuals, after local exposure(s) to sublethal oxidative stress.

Tissues are stochastically exposed to stressful agents during life. A good argument in favor of the stochastic evolution of tissues with aging is that the variability of the maximum number of population doublings that normal fibroblasts can make increases with the age of the donor, as clearly seen from published data [61]. Also fibroblasts taken from some human centenarians can make as many population doublings as fibroblasts from young donors, whereas fibroblasts from another centenarian will make only a few population doublings [62,63]. Such stochasticity is due in part to lifetime exposures to stress. Stochastic exposure to stress can be endogenous (local inflammation,

microinflammation generating abnormal reactive oxygen species concentrations [64], etc.) or exogenous (exposure of skin fibroblasts to UV irradiation, for instance [65]), including therapeutic agents (for instance, psoralen + UVA therapy [66]). Also it is likely that cells in a senescence-like phenotype could play a role in the age-related changes of tissues in a usual environment. One example is that human diploid fibroblasts in 20% O₂-induced or H₂O₂-induced senescence-like phenotype can modify the physiology of preneoplastic keratinocytes [67], favoring their transformation, which is of paramount importance because cells in such stress-induced phenotype could accumulate during the life span, possibly explaining in part why the rate of cancer increases with aging [68].

The words “inadequate culture conditions” [49] were used to describe any stress-related senescence-like phenotype. However, stressful situations exist in vivo that might lead to such phenotype, especially in situations of repeated stress. Cells in a stress-induced senescence-like phenotype in vivo could thereby participate in tissue (patho)physiology during aging and in several (age-related) diseases. SA β-gal activity-positive endothelial cells are found a few weeks after balloon angioplasty in arteries (and thus have no time to reach such a state through cell divisions only). SA β-gal-activity is found in chronic hepatitis and tissue surrounding liver carcinomas (for a review see [2]). It is easy to understand that “true” replicative senescence could participate in diseases such as Duchenne muscular dystrophy through exhaustion of the proliferative potential of muscle satellite cells [7,69], although local inflammation might also play a role and generate a stress-induced senescence-like phenotype with accelerated telomere shortening due to chronic oxidative stress. In vivo, human endothelial cells display a senescence-like phenotype in atherosclerotic lesions of the coronary arteries from patients who died from ischemic heart diseases [70]. No SA β-gal staining is observed in normal cartilage regardless of patient age. SA β-gal is observed in damaged osteoarthritis cartilage adjacent to lesions. Cultured chondrocytes isolated from sites near a lesion contain a greater percentage of SA β-gal-positive cells than cultures isolated from distal sites or normal cartilage [71,72]. HDFs excised from venous ulcers display several features of senescent cells: reduced proliferative capacity, enlarged size, SA β-gal activity, overexpression of fibronectin. TNF-α is a major component identified in the fluid of these ulcers. When neonatal skin HDFs are exposed to ulcer wound fluid or to TNF-α, the senescence-like phenotype appears [73,74], which confirms the data obtained in vitro on WI-38 HDFs [75]. Human aging itself is accompanied by an elevation of the circulating levels of TNF-α (for a review see [76]).

Acknowledgments

Aline Chrétien is the recipient of a FRIA fellowship, Belgium. O. Toussaint is a Research Associate of the FNRS, Belgium. We thank Dr. Karin Hjermø, Andrea Lorentzen, and Kate Rafn (from the Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark) for help with MALDI-MS and/or -MS/MS analysis,

for LC-MS/MS measurements, and for providing us with MALDI-MS mass spectra files. We acknowledge the Région Wallonne/FSE for the First-Europe projects “Arrayage” and “CosmUV,” the First-DEI project “Cosmet-X,” and the “Réseaux II Senegene” and “Nanotoxic” projects. We also thank the European Commission for the Integrated Projects Geha (LSHM-CT-2004-503270) and Proteomage (LSHM-CT-2005-518230), Coordination Action Link-Age (LSHM-CT-2005-513866), and “Matiss” Marie Curie Project (MTKI-CT-2006-042768).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.026](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.026).

References

- Hayflick, L.; Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**:585–621; 1961.
- Serrano, M.; Blasco, M. A. Putting the stress on senescence. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:748–753; 2001.
- Reddel, R. R. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**:477–484; 2000.
- Wright, W. E.; Shay, J. W. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:98–103; 2001.
- Campisi, J.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:729–740; 2007.
- Fripiat, C.; Dewelle, J.; Remacle, J.; Toussaint, O. Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:1334–1346; 2002.
- Wright, W. E.; Shay, J. W. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* **20**:682–688; 2002.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:7915–7922; 1993.
- Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**:20313–20316; 1997.
- Dumont, P.; Burton, M.; Chen, Q. M.; Gonos, E. S.; Fripiat, C.; Mazarati, J. B.; Eliaers, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:361–373; 2000.
- Chen, Q.; Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:4130–4134; 1994.
- Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O., et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:9363–9367; 1995.
- Fripiat, C.; Chen, Q. M.; Zdanov, S.; Magalhaes, J. P.; Remacle, J.; Toussaint, O. Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**:2531–2537; 2001.
- Chen, Q. M.; Tu, V. C.; Catania, J.; Burton, M.; Toussaint, O.; Dilley, T. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 22):4087–4097; 2000.
- Debacq-Chainiaux, F.; Borlon, C.; Pascal, T.; Royer, V.; Eliaers, F.; Ninane, N.; Carrard, G.; Friguet, B.; de Longueville, F.; Boffe, S.; Remacle, J.; Toussaint, O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J. Cell Sci.* **118**:743–758; 2005.
- Pascal, T.; Debacq-Chainiaux, F.; Chretien, A.; Bastin, C.; Dabee, A. F.; Bertholet, V.; Remacle, J.; Toussaint, O. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* **579**:3651–3659; 2005.
- de Magalhaes, J. P.; Chainiaux, F.; de Longueville, F.; Mainfroid, V.; Migeot, V.; Marcq, L.; Remacle, J.; Salmon, M.; Toussaint, O. Gene expression and regulation in H2O2-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase. *Exp. Gerontol.* **39**:1379–1389; 2004.
- Zdanov, S.; Debacq-Chainiaux, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett.* **580**:6455–6463; 2006.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275; 1951.
- Larsen, M. R.; Cordwell, S. J.; Roepstorff, P. Graphite powder as an alternative or supplement to reversed-phase material for desalting and concentration of peptide mixtures prior to matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* **2**:1277–1287; 2002.
- Hjemo, K.; Alm, R.; Canback, B.; Matthiesen, R.; Trajkovski, K.; Bjork, L.; Roepstorff, P.; Emanuelsson, C. Down-regulation of the strawberry Bet v 1-homologous allergen in concert with the flavonoid biosynthesis pathway in colorless strawberry mutant. *Proteomics* **6**:1574–1587; 2006.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45; 2001.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**:55–63; 1983.
- Ren, X. D.; Kiosses, W. B.; Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**:578–585; 1999.
- Sander, E. E.; ten Klooster, J. P.; van Delft, S.; van der Kammen, R. A.; Collard, J. G. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* **147**:1009–1022; 1999.
- Deroanne, C. F.; Hamelryckx, D.; Ho, T. T.; Lambert, C. A.; Catroux, P.; Lapiere, C. M.; Nussgens, B. V. Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J. Cell Sci.* **118**:1173–1183; 2005.
- Ridley, A. J. The GTP-binding protein Rho. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:1225–1229; 1997.
- Zhang, S.; Han, J.; Sells, M. A.; Chernoff, J.; Knaus, U. G.; Ulevitch, R. J.; Bokoch, G. M. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* **270**:23934–23936; 1995.
- Nobes, C. D.; Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**:53–62; 1995.
- Borbiev, T.; Birukova, A.; Liu, F.; Nurmukhambetova, S.; Gerthoffer, W. T.; Garcia, J. G.; Verin, A. D. p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**:L911–L918; 2004.
- Yan, Q.; Sage, E. H. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J. Histochem. Cytochem.* **47**:1495–1506; 1999.
- Rodemann, H. P.; Binder, A.; Burger, A.; Guven, N.; Loffler, H.; Bamberg, M. The underlying cellular mechanism of fibrosis. *Kidney Inter., Suppl.* **54**:S32–S36; 1996.
- Goncharova, E. A.; Shirinsky, V. P.; Shevelev, A. Y.; Marston, S. B.; Vorotnikov, A. V. Actomyosin cross-linking by caldesmon in non-muscle cells. *FEBS Lett.* **497**:113–117; 2001.
- Eves, R.; Webb, B. A.; Zhou, S.; Mak, A. S. Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* **119**:1691–1702; 2006.
- Buccione, R.; Orth, J. D.; McNiven, M. A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:647–657; 2004.
- Linder, S.; Kopp, P. Podosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **118**:2079–2082; 2005.
- Moreau, V.; Tatin, F.; Varon, C.; Genot, E. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol.* **23**:6809–6822; 2003.

- [38] Spinardi, L.; Marchisio, P. C. Podosomes as smart regulators of cellular adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* **85**:191–194; 2006.
- [39] Foster, D. B.; Huang, R.; Hatch, V.; Craig, R.; Graceffa, P.; Lehman, W.; Wang, C. L. Modes of caldesmon binding to actin: sites of caldesmon contact and modulation of interactions by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **279**:53387–53394; 2004.
- [40] Eppinga, R. D.; Li, Y.; Lin, J. L.; Lin, J. J. Tropomyosin and caldesmon regulate cytokinesis speed and membrane stability during cell division. *Arch. Biochem. Biophys.* **456**:161–174; 2006.
- [41] Somara, S.; Bitar, K. N. Phosphorylated HSP27 modulates the association of phosphorylated caldesmon with tropomyosin in colonic smooth muscle. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* **291**:G630–G639; 2006.
- [42] Grune, T.; Reinheckel, T.; North, J. A.; Li, R.; Bescos, P. B.; Shringarpure, R.; Davies, K. J. Ezrin turnover and cell shape changes catalyzed by proteasome in oxidatively stressed cells. *FASEB J.* **16**:1602–1610; 2002.
- [43] Zdanov, S.; Remacle, J.; Toussaint, O. Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067**:210–216; 2006.
- [44] Begum, R.; Nur, E. K. M. S.; Zaman, M. A. The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Exp. Mol. Med.* **36**:358–366; 2004.
- [45] Ridley, A. J. Rho: theme and variations. *Curr. Biol.* **6**:1256–1264; 1996.
- [46] Gumbiner, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345–357; 1996.
- [47] Mitchison, T. J.; Cramer, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* **84**:371–379; 1996.
- [48] Craig, S. W.; Johnson, R. P. Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:74–85; 1996.
- [49] Ramirez, R. D.; Morales, C. P.; Herbert, B. S.; Rohde, J. M.; Passons, C.; Shay, J. W.; Wright, W. E. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* **15**:398–403; 2001.
- [50] Dumont, P.; Burton, M.; Chen, Q. M.; Fripiat, C.; Pascal, T.; Dierick, J. F.; Eliaers, F.; Chainiaux, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Human diploid fibroblasts display a decreased level of c-fos mRNA at 72 hours after exposure to sublethal H₂O₂ stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**:306–309; 2000.
- [51] Fripiat, C.; Chen, Q. M.; Remacle, J.; Toussaint, O. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp. Gerontol.* **35**:733–745; 2000.
- [52] Dierick, J. F.; Kalume, D. E.; Wenders, F.; Salmon, M.; Dieu, M.; Raes, M.; Roepstorff, P.; Toussaint, O. Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.* **531**:499–504; 2002.
- [53] Zdanov, S.; Bernard, D.; Debacq-Chainiaux, F.; Martien, S.; Gosselin, K.; Vercamer, C.; Chelli, F.; Toussaint, O.; Abbadie, C. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp. Cell Res.* **313**:3046–3056; 2007.
- [54] Cho, K. A.; Ryu, S. J.; Oh, Y. S.; Park, J. H.; Lee, J. W.; Kim, H. P.; Kim, K. T.; Jang, I. S.; Park, S. C. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J. Biol. Chem.* **279**:42270–42278; 2004.
- [55] Dierick, J. F.; Eliaers, F.; Remacle, J.; Raes, M.; Fey, S. J.; Larsen, P. M.; Toussaint, O. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem. Pharmacol.* **64**:1011–1017; 2002.
- [56] Brack, C.; Lithgow, G.; Osiewacz, H.; Toussaint, O. EMBO Workshop report: molecular and cellular gerontology. Serpiano, Switzerland, September 18–22, 1999. *EMBO J.* **19**:1929–1934; 2000.
- [57] Toussaint, O.; Remacle, J.; Clark, B. F.; Gonos, E. S.; Franceschi, C.; Kirkwood, T. B. Biology of ageing. *Bioessays* **22**:954–956; 2000.
- [58] Dumont, P.; Royer, V.; Pascal, T.; Dierick, J. F.; Chainiaux, F.; Fripiat, C.; de Magalhaes, J. P.; Eliaers, F.; Remacle, J.; Toussaint, O. Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.* **502**:109–112; 2001.
- [59] Toussaint, O.; Dumont, P.; Remacle, J.; Dierick, J. F.; Pascal, T.; Fripiat, C.; Magalhaes, J. P.; Zdanov, S.; Chainiaux, F. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one in vivo reality, two possible definitions? *Sci. World J.* **2**:230–247; 2002.
- [60] von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27**:339–344; 2002.
- [61] Cristofalo, V. J.; Volker, C.; Francis, M. K.; Tresini, M. Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **8**:43–80; 1998.
- [62] Tesco, G.; Vergelli, M.; Grassilli, E.; Salomoni, P.; Bellesia, E.; Sikora, E.; Radziszewska, E.; Barbieri, D.; Latorraca, S.; Fagiolo, U.; Santacaterina, S.; Amaducci, L.; Tiozzo, R.; Franceschi, C.; Sorbi, S. Growth properties and growth factor responsiveness in skin fibroblasts from centenarians. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**:912–916; 1998.
- [63] Maier, A. B.; le Cessie, S.; de Koning-Treumiet, C.; Blom, J.; Westendorp, R. G.; van Heemst, D. Persistence of high-replicative capacity in cultured fibroblasts from nonagenarians. *Aging Cell* **6**:27–33; 2007.
- [64] Giacomoni, P. U.; Declercq, L.; Hellemans, L.; Maes, D. Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data. *JUBMB Life* **49**:259–263; 2000.
- [65] Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Baudschun, R.; Wenk, J. UV-induced reactive oxygen species in photo-carcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* **378**:1247–1257; 1997.
- [66] Borlon, C.; Debacq-Chainiaux, F.; Hinrichs, C.; Scharffetter-Kochanek, K.; Toussaint, O.; Wlaschek, M. The gene expression profile of psoralen plus UVA-induced premature senescence in skin fibroblasts resembles a combined DNA-damage and stress-induced cellular senescence response phenotype. *Exp. Gerontol.* **42**:911–923; 2007.
- [67] Green, H.; Rheinwald, J. G.; Sun, T. T. Properties of an epithelial cell type in culture: the epidermal keratinocyte and its dependence on products of the fibroblast. *Prog. Clin. Biol. Res.* **17**:493–500; 1977.
- [68] Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:12072–12077; 2001.
- [69] Acharyya, S.; Villalta, S. A.; Bakkar, N.; Bupha-Intr, T.; Janssen, P. M.; Carathers, M.; Li, Z. W.; Beg, A. A.; Ghosh, S.; Sahenk, Z.; Weinstein, M.; Gardner, K. L.; Rafael-Fortney, J. A.; Karin, M.; Tidball, J. G.; Baldwin, A. S.; Guttridge, D. C. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **117**:889–901; 2007.
- [70] Minamino, T.; Miyachi, H.; Yoshida, T.; Ishida, Y.; Yoshida, H.; Komuro, I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* **105**:1541–1544; 2002.
- [71] Martin, J. A.; Buckwalter, J. A. Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology* **39**:145–152; 2002.
- [72] Price, J. S.; Waters, J. G.; Darrah, C.; Pennington, C.; Edwards, D. R.; Donell, S. T.; Clark, I. M. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* **1**:57–65; 2002.
- [73] Mendez, M. V.; Raffetto, J. D.; Phillips, T.; Menzoian, J. O.; Park, H. Y. The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: a potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J. Vasc. Surg.* **30**:734–743; 1999.
- [74] Mendez, M. V.; Stanley, A.; Park, H. Y.; Shon, K.; Phillips, T.; Menzoian, J. O. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J. Vasc. Surg.* **28**:876–883; 1998.
- [75] Dumont, P.; Balbeur, L.; Remacle, J.; Toussaint, O. Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1alpha and TNF-alpha: senescence associated beta-galactosidase activity and morphotype transition. *J. Anat.* **197** (Pt 4): 529–537; 2000.
- [76] Franceschi, C.; Monti, D.; Barbieri, D.; Salvioli, S.; Grassilli, E.; Capri, E.; Troiano, L.; Tropea, F.; Guido, M.; Salomoni, P.; Benatti, F.; Macchioni, S.; Sansoni, P.; Fagnano, F.; Paganelli, R.; Bagnara, G.; Gerli, R.; De Benedicts, G.; Baggio, G.; Cossarizza, A. Research status and strategies. Plenum Press, New York; 1996.

A

Names	Sequences	Positions (bp)	GenBank
L-caldesmon forward reverse	5'-CCGCATCAATGAATGGCTAACT-3' 5'-CGTCTCCTGGTCTCAAGTCAGA-3'	1740-1761 1801-1822	NM-033139
ezrin forward reverse	5'-GCAATCCAGCCAAATACAACCTG-3' 5'-CCACATAGTGGAGGCCAAAGTA-3'	189-210 264-285	NM-003379
GAP-cdc42 forward reverse	5'-CCCTGCTCACCTTTGACCTCTA-3' 5'-CCTCTGGCTTTTCATCAATGTTG-3'	1052-1073 1095-1116	NM-004308
plastin-T forward reverse	5'-CCAGTTTGGCAGTTGTGGATTT-3' 5'- CTGTTAGATTGCCACTCTTCACAAG-3'	1739-1760 1798-1822	NM-005032
HSP27 forward reverse	5'-TCCCTGGATGTCAACCACTTC-3' 5'-CTCGTGCTTGCCGGTGAT-3'	314-334 381-398	BC012768
GAPDH forward reverse	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	942-963 1033-1053	NM_002046

B

Names	Sequences
rac1 siRNA	5'-GAUAAAGACACGAUCGAGATT-3' 5'-UCUCGAUCGUGUCUUUAUATT-3'
cdc42 siRNA	5'-GAUAACUCACCACUGUCCATT-3' 5'-UGGACAGUGGUGAGUUAUUCTT-3'

Table S.1: A: Sequences and positions of the primers used in RT real-time PCR analysis.
B: Sequences of the siRNA invalidating rac1 and cdc42.

A: Increased intensity

	Spot #	Identification	Identified by		Score	Matching peptides	SC (%)
			MS	MS/MS			
1	105	Ezrin	X		128	20	35
2	126	Caldesmon	X		100	10	23
3	243	Plastin T isoform	X	X	371	22	47
4	710	β -actin	X	X	344	13	57
5	721	26S proteasome-associated pad1 homolog	X		84	9	40
6	752	Proteasome alpha 1 subunit	X	X	296/518 by LC-MSMS	12/10	56/39
7	783	Mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor			1056 by LC-MSMS	16	68
		+			+	+	+
		heat shock protein 27			481 by LC-MSMS	7	60
8	825	Pyridoxine 5'-phosphate oxidase	X	X	241	6	28
		+			+	+	+
		heat shock protein 27	X	X	104	5	33
9	874	Vacuolar protein sorting 28	X	X	129	9	59
10	4353	cdc42 GTPase-activating protein	X		162	16	52
11	4920	Vimentin	X	X	385	9	19
12	4965	Napsin A	X	X	309	15	72
13	4966	Proteasome 26S non-ATPase subunit 10	X	X	157	6	36
14	4997	BAF complex 53 KDa subunit			892 by LC-MSMS	16	54
15	5087	Phosphoglycerate mutase	X		105	10	46
16	5217	Poly (rC) binding protein			210 by LC-MSMS	3	15
17	619	Osteonectin	X	X	80	7	24

B: Decreased intensity

	Spot #	Identification	Identified by		Score	Matching peptides	SC (%)
			MS	MS/MS			
18	5103	Proteasome alpha 1 subunit	X	X	315	13	56
19	442	HLA-B associated transcript 1	X	X	126	10	32
20	455	HLA-B associated transcript 1	X	X	333/ 767 by LC-MSMS	11 / 13	29/51
21	762	14-3-3 σ			872 by LC-MSMS	15	56
22	5156	Ribonuclease/angiogenin inhibitor	X	X	379	17	65
23	5187a	Protein disulfide isomerase ER-60			1189 by LC-MSMS	21	46
23	5187b	Protein disulfide isomerase ER-60	X	X	151 / 720 by LC-MSMS	14 / 12	34
23	5187c	Vacuolar H ⁺ -ATPase 56000 subunit	X	X	327	23	57
24	5194	Aldehyde dehydrogenase	X	X	148	13	34

Table S.2: List of proteins identified in the proteome analysis comparing IMR-90 fibroblasts in H₂O₂-induced senescent-like phenotype of after stimulation with TGF- β 1. Spot number (spot #), Mascot score obtained for a combined search of manually obtained MALDI-TOF/TOF MS and MS/MS data or obtained for a search of MALDI-TOF MS data alone, number of matching peptides confirmed and sequences coverage (sc) are given. When protein was identified by MALDI-TOF MS data alone in Mascot search, a cross is annotated in the column "MS". When protein was identified by MALDI-TOF MS in combination with MALDI-TOF/TOF MS/MS data, a cross is annotated in the column "MS" and a second one is annotated in the column "MS/MS". When protein was identified by LC-MS/MS data, the corresponding score is given.

A: Increases in spot intensity in treated cells B: Decreases in spot intensity in treated cells.

Les tables S3 et S4 du matériel supplémentaire concernant les données obtenues en spectrométrie de masse sont présentées en annexe 1 à la page 170 du manuscrit.

Supplementary material

Part 1: Study of of L-CaD, ezrin, cdc42-GAP, T-plastin and HSP27 mRNA abundance (primer sequences)

Results from proteome analysis suggest that L-CaD, ezrin, cdc42-GAP, T-plastin and HSP27 present an increase in spot intensity in cells treated with H₂O₂. A possible explanation of this phenomenon is the increase of corresponding mRNA abundance. Sequences and positions of the primers were determined (Primer Express 1.5 software, Applied Biosystems, Foster City, USA), listed in table S.1A and L-CaD, ezrin, cdc42-GAP, T-plastin and HSP27 mRNA abundance were analyzed by RT-real time PCR.

Part 2: proteomic analysis

IMR-90 HDFs were treated with 5 different experimental conditions (figure 1A). Cells were treated for 1 or 2 h to 150 μ M H₂O₂ (condition 1), incubated with TGF- β 1 for 72 h (condition 2), incubated or not with anti-TGF- β 1 antibodies (conditions 3 and 4) or incubated with anti-TGF- β 1 antibodies starting at 12 h before treatment with H₂O₂, and went on during treatment (condition 5).

Statistical analysis revealed 28 spots with a significant 2-fold difference of integrated intensity. Seventeen changes in spot intensity were found during establishment of H₂O₂-induced senescent-like phenotype, and seven changes in spot intensity were found in TGF- β 1 stimulated IMR-90 HDFs.

We identified the proteins corresponding to the spots pinpointed in this analytical step. When MS and MS/MS analysis were performed, the score obtained in Mascot database, number of matching peptides and sequence coverage (sc) were listed in table S.2A (increases in spot intensity in treated cells) or table S.2B (decreases in spot intensity in treated cells). All the identifications were obtained with 5 peptides or more (table S.3 and S.4). Let us first focused on the TGF- β 1-independent changes with a potential role in morphogenesis and appearance of actin stress fibers observed in senescent-like phenotype: β -actin, ezrin, L-CaD, cdc42-GAP, T-plastin and HSP27. β -actin is a structural component of the cytoskeleton. It plays a role in motor activity.

A previous proteomic study on WI-38 HDFs already identified hypothetical fragments of actin playing a role in stress fibers [1].

Ezrin belongs to the ERM family (ezrin/radixin/moesin). These proteins participate in capping, fragmentation and nucleation of actin. They are involved in the formation of microvilli,

cell adhesion sites and membrane ruffling. Another member of the family, moesin was suggested to undergo phosphorylation upon senescence [2].

HSP27 is involved in the detection of oxidized proteins after stress [3]. Cytosolic HSP27 can prevent apoptosis through interaction with key components of the apoptotic pathways like cytochrome c, Akt and Daxx [4]. Given HSP27 can be phosphorylated on different sites, different spots containing HSP27 can appear on 2DGE [5]. Non-phosphorylated HSP27 can cap actin and block its polymerization. Phosphorylated HSP27 can favor actin polymerization and stabilize actin microfilaments. Previous proteome analyses identified HSP27 as up-regulated in senescence of HDFs observed after passaging under 20 % O₂ [6].

Caldesmon (CaD) is an actin-binding protein able to inhibit actomyosin ATPase activity: it prevents the strong binding of myosin heads to actin in a Ca²⁺/ calmodulin- and tropomyosin-dependent manner. Two isoforms of CaD are known: heavy-CaD (h-CaD or CaD 1) and light-CaD (L-CaD or CaD 2 to 5) [7]. L-CaD is found in non-muscular cells. L-CaD inhibits the capping and fragmentation of actin by gelsolin. L-CaD favors the stabilization of actin filaments and thus cell adhesion and spread out. L-CaD expression can delay cell division [8]. L-CaD is detected in actin stress fibers, membranes ruffling and lamellipods [7].

Plastins are a family of highly conserved eukaryotic actin-binding proteins. Their isoforms display remarkable tissue specificity in mammalian tissues. T-plastin is found in epithelial and mesenchymal cells. L-plastin is present in hematopoietic and tumor cells [9]. The interaction of plastins with actin can be responsible for important conformational changes in actin, which modify the affinity of the other actin-binding proteins and regulate the cytoskeleton [10].

Now, let us briefly describe the proteins identified as undergoing a decrease in metabolic labeling after stimulation with TGF-β1 or an increase in metabolic labeling in H₂O₂-induced senescent-like phenotype independently of TGF-β1.

Protein Identification by Mass Spectrometry

TGF-β1-dependent changes:

HLA-B associated transcript 1 (spot 442 and 455, respectively -2.9- and -2.0-fold change in spot intensity) is a member of the DEAD box protein family which are RNA helicases. It is implicated in a number of cellular processes involving alteration of RNA secondary structure such as translation initiation, nuclear and mitochondrial splicing, and ribosome and spliceosome assembly. This protein is an essential splicing factor required for association of U2 small nuclear ribonucleoprotein with pre-mRNA. Based on their distribution patterns, some members of this family might be involved in embryogenesis, spermatogenesis, and cellular growth and division [11]. We identified this protein in two different but close spots on the 2DGE. Different isoforms

are known to exist for this protein. This can explain why we identified this protein from two spots at a different isoelectric point.

Stratifin (14-3-3 σ , spot 742, -2.4-fold change in spot intensity). A 14-3-3 protein (isoform τ) was already identified in a proteomic study on HDFs treated with *tert*-butylhydroperoxide in two new spots compared to control cells [6]. 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression [12].

Ribonuclease inhibitor-angiogenin complex (spot 5156, -2.3-fold change in spot intensity) is an inhibitor of pancreatic RNase and angiogenin and might also play a role in the modulation of cellular activities [13].

Protein disulfide isomerase (ER-60) was identified in two different spots (spot 5187a and 5187b, -2-fold change in spot intensity). ER-60 isomerase is located in the endoplasmic reticulum in animal cells and is a multi-functional protein with proteolytic activity, disulfide bond-dependent folding activity towards peptides and transglutaminase activity [14-16]. ER-60 facilitates the oxidative folding of glycoproteins via interaction with calnexin and calreticulin [17]. Hirokazu O. *et al.* demonstrated that the properties of the transglutaminase activity of ER-60 are different from those of known mammalian transglutaminases which active site includes a cysteine residue [18]. In study of young, adult and old fibroblasts cultured *in vitro*, the abundance of ER-60 was found to increase with fibroblasts senescence [19].

ATPase, H⁺-transporting, lysosomal 56/58kDa (spot 5187c, -2-fold change in spot intensity). H⁺-ATPases are ubiquitous in eukaryotic organisms, where they acidify several intracellular membrane compartments, including namely endosomes, lysosomes, coated vesicles, secretory vesicles, trans-Golgi network and multivesicular bodies [20].

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) (spot 5194, -2-fold change in spot intensity) is the second enzyme of the major oxidative pathway of alcohol metabolism. Reactive oxygen species (ROS) can increase the production of cytotoxic aldehydes, which can react with cellular proteins, nucleic acids, and cell membranes. Reactive aldehydes are formed mainly by lipid peroxidation and are deleterious for mitochondrial function. ALDH2 is directly implicated in the detoxification of mitochondrial reactive aldehydes [21, 22].

TGF- β 1-independent effects of H₂O₂ at sublethal concentration:

Pyridoxine 5'-phosphate oxidase was identified with Hsp27 in spot 825 (4-fold change in spot intensity). This enzyme limits the availability of vitamin B6 (or pyridoxal 5'-phosphate). Some cancer cells have notable differences in vitamin B6 metabolism compared to their normal counterparts [23].

The other protein identified with Hsp27 is the mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor (spot 783, 2.5-fold change in spot intensity). This is a mitochondrial

protein which catalyses step 3 in the β -oxidation of fatty acids. Deficiency of this complex causes sudden unexplained infant death, Reye-like syndrome, cardiomyopathy or skeletal muscle myopathy [24].

Phosphoglycerate mutase (spot 5087, 3.3-fold change in spot intensity) catalyses the reversible reaction of 3-phosphoglycerate to 2-phosphoglycerate in the glycolytic pathway. Data from another proteomic study led to the hypothesis that an increase of the activity of glycolysis could counteract at least partially the age-associated decrease in the mitochondrial capability of ATP regeneration due to accumulation of damage in the mitochondrial membranes and the mitochondrial DNA [6]. Another proteomic study performed from human dermal fibroblasts obtained from young, adult and old patients, revealed that phosphoglycerate mutase exhibited the highest levels in the adult, whereas cells from young and old subjects had similar abundance of this enzyme [19].

BRG1-associated factor (or BAF 53) was identified in spot 4997 (2.2-fold change in spot intensity). This protein is a family member of actin-related proteins (ARPs). The ARPs are involved in diverse cellular processes, including vesicular transport, spindle orientation, nuclear migration and chromatin remodeling. This protein is a 53 KDa subunit protein of the BAF (BRG1/brm-associated factor) complex in mammals, thought to facilitate transcriptional activation of specific genes by antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. Together with β -actin, it is required for maximal ATPase activity of BRG1, and for the association of the BAF complex with chromatin/matrix [25].

26S proteasome-associated pad1 homolog (poh1), a component of regulator element 19S of proteasome and proteasome alpha 1 subunit were identified (spots 721, 752 and 5103 respectively 2.2-, 3.1- and -2.8-fold change in spot intensity). Overexpression of poh 1 in yeast *Schizosaccharomyces pombe* can confer resistance to some stressful agents and UV light [26]. IMR-90 HDFs in H₂O₂-induced senescent-like phenotype contained more oxidative proteins. However, the activity of proteasome did not change [27]. It was observed that stable overexpression of subunit β 1 or β 5 of proteasome 20S increased its activity, which increased the capacity of cells to cope with different types of stress [28, 29]. A study performed with fibroblasts from young, adult and old patients found that the abundance of the proteasome subunit α 3 decreased with age while subunit α 5 increased [19]. The two spots corresponding to proteasome alpha 1 subunit could represent different isoforms of this protein.

Napsin A (spot 4965, 2.9-fold change in spot intensity) is a member of the aspartic protease family abundantly expressed in lung and kidney. This protease is a candidate protease for the proteolytic processing of surfactant precursors [30].

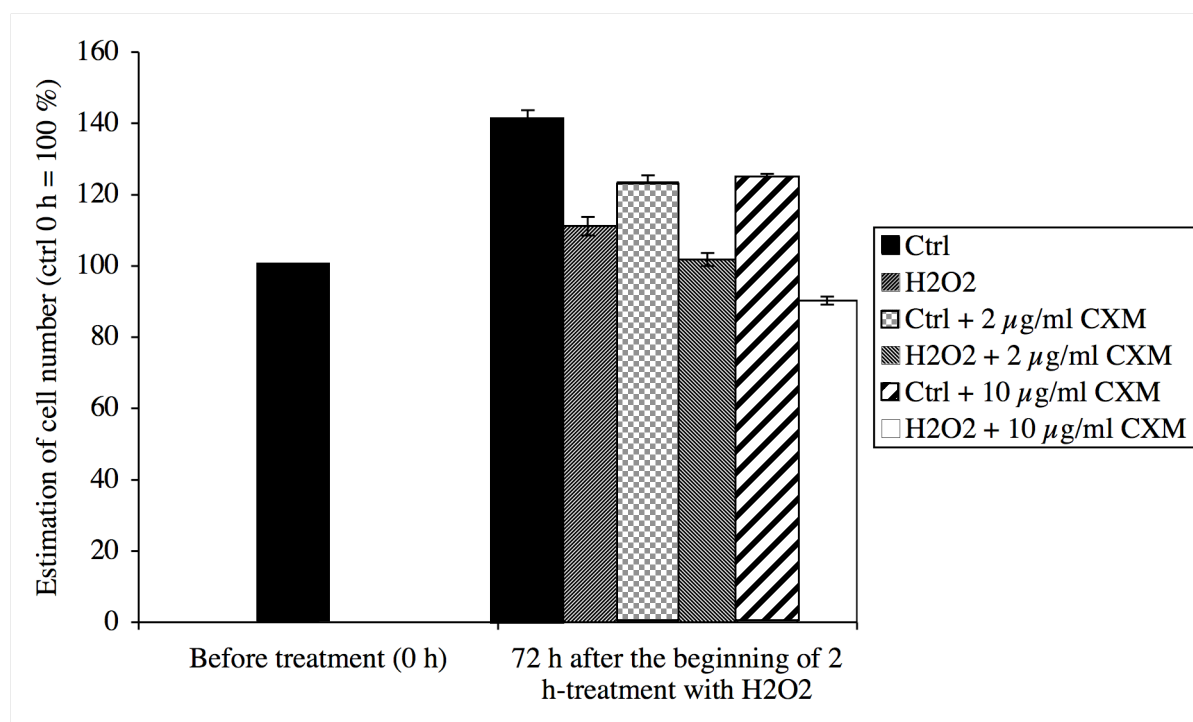


Figure S.1: Effect of cycloheximide (CXM) on IMR-90 HDFs numbers. At 2 days after the beginning of 2 h-treatment with H₂O₂, IMR-90 HDFs were incubated for 1 day with CXM at 2 or 10 µg / ml. Then MTT assay was performed. The results of the assays are expressed in percentages of the values found in control cells before treatment with H₂O₂ and are given as mean ± s.d. from three independent experiments. Statistical analysis was carried out with the Student's *t*-test either to compare the values with the control before the treatment: *NS*, non significant ($P > 0.05$); +, $0.05 > P > 0.01$; ++, $0.01 > P > 0.001$; +++, $P < 0.001$ or to compare values with the respective control at 3 days after the treatment: **, $0.01 > P > 0.001$; ***, $P < 0.001$.

Poly (rC) binding protein (spot 5217, 4.2-fold change in spot intensity) is a single-stranded nucleic acid binding protein that binds preferentially to oligo dC. This protein functions as translational coactivator of poliovirus, papillomavirus and hepatitis A virus [31].

Vacuolar protein sorting 28 (spot 874, 2.6-fold and 2.2- change in spot intensity) is involved in the endosomal sorting of cell surface receptors via a multivesicular body/late endosome pathway. In fact, it is one of the three subunits of the ESCRT-I complex (endosomal complexes required for transport) involved in the sorting of ubiquitinated proteins.

Part 3: Analysis of the effect of cycloheximide (CXM) on IMR-90 HDFs numbers

We hypothesised that the changes observed on 2DGE for ezrin, CaD and HSP27 corresponded to concomitant increased neosynthesis and increased degradation of these spots. The abundance of ezrin, L-CaD and HSP27 was estimated at 72 h after treatment with H₂O₂ with or without inhibitor of protein translation, cycloheximide (CXM), added between day 2 and day 3 after a 2 h-treatment with H₂O₂ at 150 μ M. This timing corresponded to the conditions of metabolic labeling with [³⁵S]-methionine used above and was used thereafter.

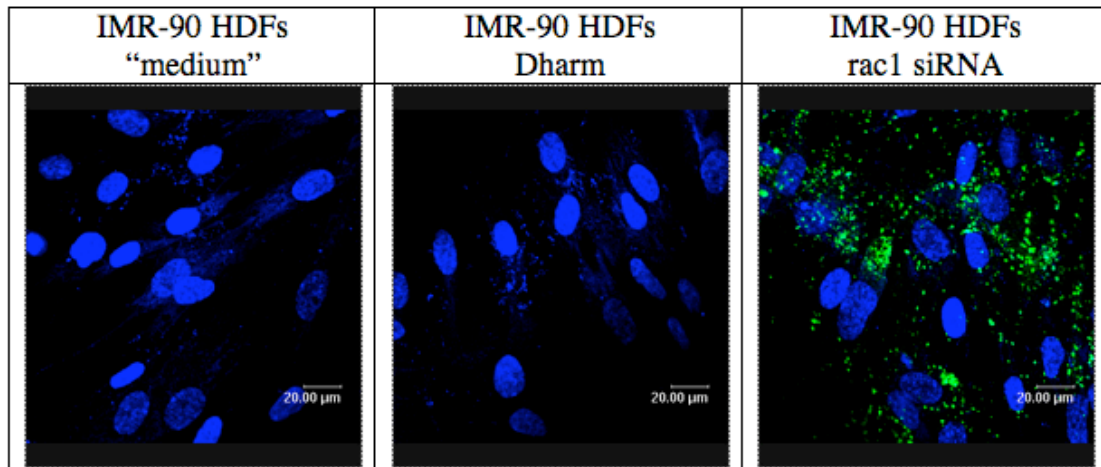
Estimation of cell number with the MTT method gave 101 ± 2.4 , 94 ± 2.4 and 91 ± 2.9 % of cells incubated for 24 h with respectively 2, 10 and 20 μ g/ml CXM, compared to control cells. These conditions of MTT assays were shown previously to represent an accurate estimation of cell numbers [32, 33]. MTT assays were also performed at 3 days after treatment with H₂O₂, just at the end of a 24 h incubation with CXM (figure S.1). Compared to day 0, the number of cells treated with H₂O₂ and with CXM was respectively similar or decreased by about 10 % at 2 or 10 μ g / ml CXM (figure S.1).

Part 4: Analysis of the role of cdc42, rac1 and p38^{MAPK}: setting of invalidation with siRNA

Our results obtained from IMR-90 HDFs treated with H₂O₂ suggested that cdc42, rac1 and p38^{MAPK} could play a role in senescent-like morphogenesis. To test this hypothesis, cdc42, rac1 and p38^{MAPK} expression were investigated using siRNA. The setting of the experimental conditions of invalidation with siRNA is described here.

The rac1 and cdc42-targeting siRNA sequences were designed previously [34, 35] and were listed in table S.1B. For invalidation of p38 α ^{MAPK}, we used a commercial mix of 4 SMARTselection-designed siRNAs verified as targeting p38 α ^{MAPK} (SMARTpool siRNA, Eurogentec). Negative siRNA was used as negative control. IMR-90 HDFs were transiently transfected with 50 nM of one of these siRNAs or incubated with Dharmafect transfection reagent alone for 36 h. For the reader, the transfection started at day -3 before the 2-h treatment with H₂O₂, which begins at day 0 (figure 1B).

A



B

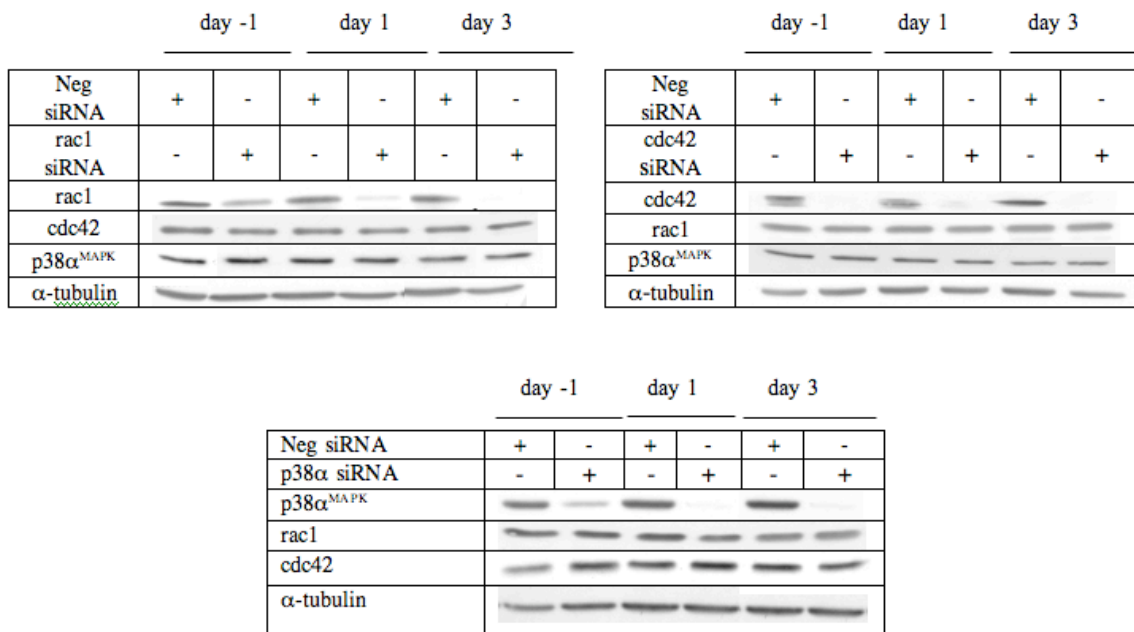


Figure S.2: A: Estimation of IMR-90 HDFs transfection efficiency with rac1 siRNA. IMR-90 HDFs were transfected with siRNA rac1 (50 nM) pre-labeled with fluorescein (green). IMR-90 HDFs incubated with Dharmafect reagent (Dharm) or with medium alone (“medium”) were also analyzed. Cells were fixed after 36 h of transfection. The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Representative fluorescence micrographs were obtained by semi-quantitative confocal microscopy.

B: Western-blot analysis of cell lysates of IMR-90 HDFs transfected with 50 nM siRNAs targeting rac1, cdc42, p38α^{MAPK} or negative siRNA. Proteins were extracted at 4, 6 or 8 days after transfection, so at day -1, 1 or 3. Rac1, cdc42 and p38α^{MAPK} protein abundance was analyzed by Western Blot. α-tubulin protein abundance was used as reference.

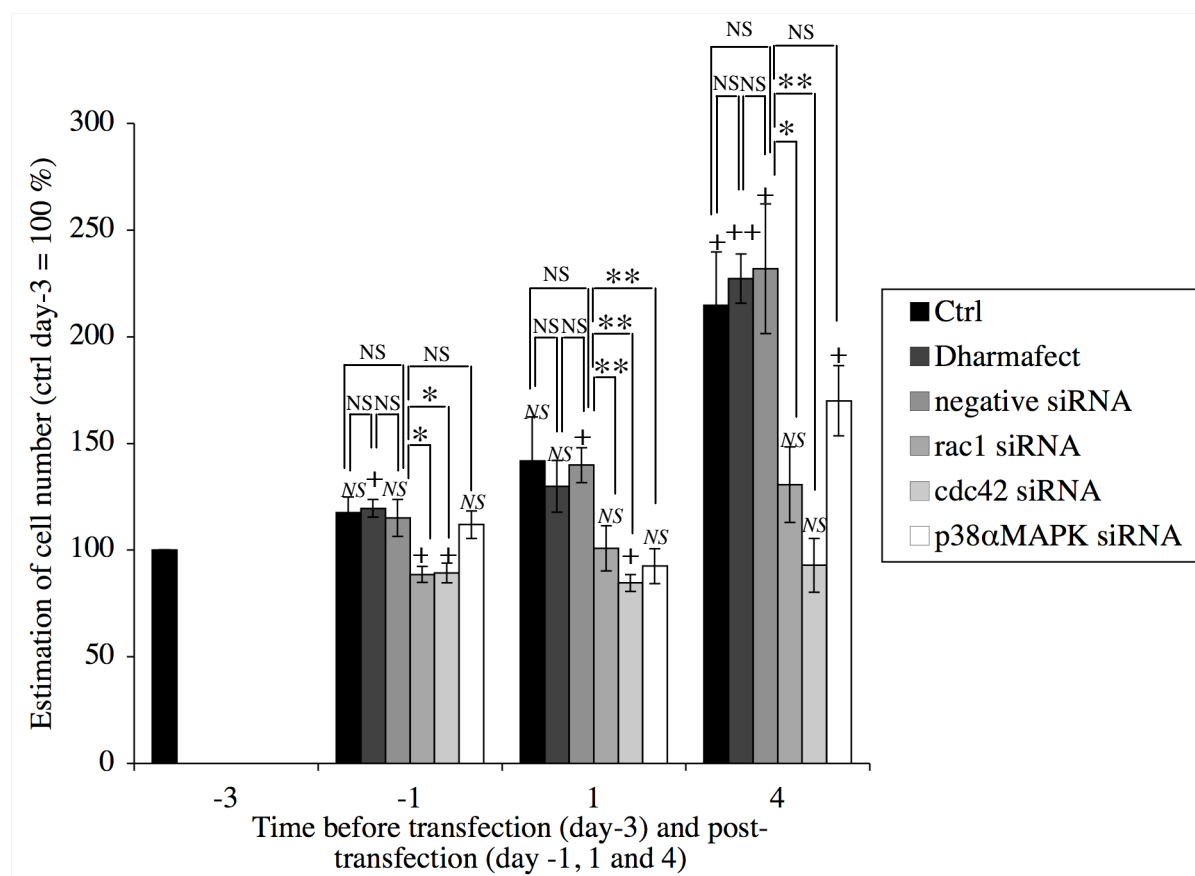


Figure S.3A: Effect of siRNA transfection on the viability of IMR-90 HDFs.

IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNA, incubated with Dharmafect (Dharm) or incubated with medium alone (“medium”) for 36 h. MTT assay was performed at day -1, 1 or 4. MTT assay of IMR-90 HDFs was also performed before transfection at day -3. The results are expressed in percentages of the values found in control cells before transfection (day -3) and are given as mean \pm s.d. from three independent experiments. Statistical analysis was carried out with the Student’s *t*-test either to compare the values to the control cells before transfection (day -3): NS, non significant ($P > 0.05$); +, $0.05 > P > 0.01$; ++, $0.001 > P > 0.001$ or to the respective controls of transfection at day -1, 1 and 4 in this model of transfection: NS, non significant ($P > 0.05$); *, $0.05 > P > 0.01$; **, $0.001 > P > 0.001$.

After transfection of rac1 siRNA pre-labeled with fluorescein, confocal microscopy allowed to estimate that at least 90% of IMR-90 HDFs were transfected after 36 h in presence of siRNA in these conditions (figure S.2A).

A near complete reduction of rac1, cdc42 or p38^{MAPK} mRNA abundance was observed at 1 day after transfection (data not shown). As for cdc42, a complete disappearance of the protein from the Western blots was observed at day -1. As for rac1 and p38^{MAPK}, more than 90 % of these proteins disappeared at day 1 with complete disappearance at day 3. We also verified that invalidating one of the protein candidates did not affect the two other candidates on days -1, 1 and 3 (figure S.2B).

MTT assays were performed on day -1, 1 and 4 on IMR-90 HDFs in normal conditions, IMR-90 HDFs incubated with Dharmafect transfection reagent for 36 h at day -3, or IMR-90 HDFs transfected at day -3, with siRNA of rac1, cdc42 or p38^{MAPK} (figure S.3A). Cells in normal conditions, incubated with transfection reagent or transfected with negative siRNA proliferated equally. The proliferation of the cells transfected with rac1 siRNA was nearly totally abolished at day 4. No growth at all was observed as for cdc42 siRNA. A slight recovery of the proliferation potential was observed at day 4 with p38^{MAPK} siRNA.

Then MTT assays were performed at day 4 on cells treated for 2 h with H₂O₂ at 150 μ M at day 0 or not (figure S.3B). Similar results were observed for cells treated with H₂O₂ alone, incubated with transfection reagent or transfected with negative siRNA or with rac1 and p38^{MAPK} siRNA. Values lower than the control at day 0 were found for cells transfected with cdc42 siRNA.

Supplementary references

- [1] Mashima, T.;Naito, M.;Tsuruo, T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18:2423-2430; 1999.
- [2] Benvenuti, S.;Cramer, R.;Quinn, C. C.;Bruce, J.;Zvelebil, M.;Corless, S.;Bond, J.;Yang, A.;Hockfield, S.;Burlingame, A. L.;Waterfield, M. D.;Jat, P. S. Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Proteomics* 1:280-292; 2002.
- [3] Negre-Aminou, P.;van Leeuwen, R. E.;van Thiel, G. C.;van den, I. P.;de Jong, W. W.;Quinlan, R. A.;Cohen, L. H. Differential effect of simvastatin on activation of Rac(1) vs. activation of the heat shock protein 27-mediated pathway upon oxidative stress, in human smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 64:1483-1491; 2002.
- [4] Dalle-Donne, I.;Rossi, R.;Milzani, A.;Di Simplicio, P.;Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* 31:1624-1632; 2001.
- [5] Faucher, C.;Capdevielle, J.;Canal, I.;Ferrara, P.;Mazarguil, H.;McGuire, W. L.;Darbon, J. M. The 28-kDa protein whose phosphorylation is induced by protein kinase C activators in MCF-7 cells belongs to the family of low molecular mass heat shock proteins and is the estrogen-regulated 24-kDa protein. *J Biol Chem* 268:15168-15173; 1993.
- [6] Dierick, J. F.;Kalume, D. E.;Wenders, F.;Salmon, M.;Dieu, M.;Raes, M.;Roepstorff, P.;Toussaint, O. Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* 531:499-504; 2002.
- [7] Goncharova, E. A.;Shirinsky, V. P.;Shevelev, A. Y.;Marston, S. B.;Vorotnikov, A. V. Actomyosin cross-linking by caldesmon in non-muscle cells. *FEBS Lett* 497:113-117; 2001.
- [8] Mak, A. S.;Watson, M. H.;Litwin, C. M.;Wang, J. H. Phosphorylation of caldesmon by cdc2 kinase. *J Biol Chem* 266:6678-6681; 1991.
- [9] Arpin, M.;Friederich, E.;Algrain, M.;Vernel, F.;Louvard, D. Functional differences between L- and T-plastin isoforms. *J Cell Biol* 127:1995-2008; 1994.
- [10] Hanein, D.;Matsudaira, P.;DeRosier, D. J. Evidence for a conformational change in actin induced by fimbrin (N375) binding. *J Cell Biol* 139:387-396; 1997.
- [11] Peelman, L. J.;Chardon, P.;Nunes, M.;Renard, C.;Geffrotin, C.;Vaiman, M.;Van Zeveren, A.;Coppieters, W.;van de Weghe, A.;Bouquet, Y.;et al. The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionarily conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family. *Genomics* 26:210-218; 1995.
- [12] Hermeking, H.;Lengauer, C.;Polyak, K.;He, T. C.;Zhang, L.;Thiagalingam, S.;Kinzler, K. W.;Vogelstein, B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1:3-11; 1997.
- [13] Papageorgiou, A. C.;Shapiro, R.;Acharya, K. R. Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *Embo J* 16:5162-5177; 1997.
- [14] Urade, R.;Kito, M. Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER-60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 312:83-86; 1992.
- [15] Zapun, A.;Darby, N. J.;Tessier, D. C.;Michalak, M.;Bergeron, J. J.;Thomas, D. Y. Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* 273:6009-6012; 1998.
- [16] Chandrashekar, R.;Tsuji, N.;Morales, T.;Ozols, V.;Mehta, K. An ERp60-like protein from the filarial parasite *Dirofilaria immitis* has both transglutaminase and protein disulfide isomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:531-536; 1998.
- [17] Urade, R.;Okudo, H.;Kato, H.;Moriyama, T.;Arakaki, Y. ER-60 domains responsible for interaction with calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 43:8858-8868; 2004.

- [18] Okudo, H.;Kito, M.;Moriyama, T.;Ogawa, T.;Urade, R. Transglutaminase activity of human ER-60. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1423-1426; 2002.
- [19] Boraldi, F.;Bini, L.;Liberatori, S.;Armini, A.;Pallini, V.;Tiozzo, R.;Pasquali-Ronchetti, I.;Quaglino, D. Proteome analysis of dermal fibroblasts cultured in vitro from human healthy subjects of different ages. *Proteomics* 3:917-929; 2003.
- [20] Wang, Z. Q.;Gluck, S. Isolation and properties of bovine kidney brush border vacuolar H(+)-ATPase. A proton pump with enzymatic and structural differences from kidney microsomal H(+)-ATPase. *J Biol Chem* 265:21957-21965; 1990.
- [21] Chen, J. J.;Yu, B. P. Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction. *Aging (Milano)* 8:334-340; 1996.
- [22] Davydov, V. V.;Dobaeva, N. M.;Bozhkov, A. I. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Exp Gerontol* 39:11-16; 2004.
- [23] Ngo, E. O.;LePage, G. R.;Thanassi, J. W.;Meisler, N.;Nutter, L. M. Absence of pyridoxine-5'-phosphate oxidase (PNPO) activity in neoplastic cells: isolation, characterization, and expression of PNPO cDNA. *Biochemistry* 37:7741-7748; 1998.
- [24] Spiekerkoetter, U.;Sun, B.;Khuchua, Z.;Bennett, M. J.;Strauss, A. W. Molecular and phenotypic heterogeneity in mitochondrial trifunctional protein deficiency due to beta-subunit mutations. *Hum Mutat* 21:598-607; 2003.
- [25] Zhao, K.;Wang, W.;Rando, O. J.;Xue, Y.;Swiderek, K.;Kuo, A.;Crabtree, G. R. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95:625-636; 1998.
- [26] Spataro, V.;Toda, T.;Craig, R.;Seeger, M.;Dubiel, W.;Harris, A. L.;Norbury, C. Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit. *J Biol Chem* 272:30470-30475; 1997.
- [27] Debacq-Chainiaux, F.;Borlon, C.;Pascal, T.;Royer, V.;Eliaers, F.;Ninane, N.;Carrard, G.;Friguet, B.;de Longueville, F.;Boffe, S.;Remacle, J.;Toussaint, O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 118:743-758; 2005.
- [28] Chondrogianni, N.;Stratford, F. L.;Trogakos, I. P.;Friguet, B.;Rivett, A. J.;Gonos, E. S. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* 278:28026-28037; 2003.
- [29] Kim, C. H.;Park, D. U.;Chung, A. S.;Zou, Y.;Jung, K. J.;Sung, B. K.;Yu, B. P.;Chung, H. Y. Proteomic analysis of post-mitochondrial fractions of young and old rat kidney. *Exp Gerontol* 39:1155-1168; 2004.
- [30] Chuman, Y.;Bergman, A.;Ueno, T.;Saito, S.;Sakaguchi, K.;Alaiya, A. A.;Franzen, B.;Bergman, T.;Arnott, D.;Auer, G.;Appella, E.;Jornvall, H.;Linder, S. Napsin A, a member of the aspartic protease family, is abundantly expressed in normal lung and kidney tissue and is expressed in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett* 462:129-134; 1999.
- [31] Blyn, L. B.;Swiderek, K. M.;Richards, O.;Stahl, D. C.;Semler, B. L.;Ehrenfeld, E. Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11115-11120; 1996.
- [32] de Magalhaes, J. P.;Chainiaux, F.;Remacle, J.;Toussaint, O. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett* 523:157-162; 2002.
- [33] Zdanov, S.;Debacq-Chainiaux, F.;Remacle, J.;Toussaint, O. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett* 580:6455-6463; 2006.

- [34] Deroanne, C. F.;Hamelryckx, D.;Ho, T. T.;Lambert, C. A.;Catroux, P.;Lapiere, C. M.;Nusgens, B. V. Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci* 118:1173-1183; 2005.
- [35] Nikolova, E.;Mitev, V.;Zhelev, N.;Deroanne, C. F.;Poumay, Y. The small Rho GTPase Rac1 controls normal human dermal fibroblasts proliferation with phosphorylation of the oncoprotein c-myc. *Biochem Biophys Res Commun* 359:834-839; 2007.

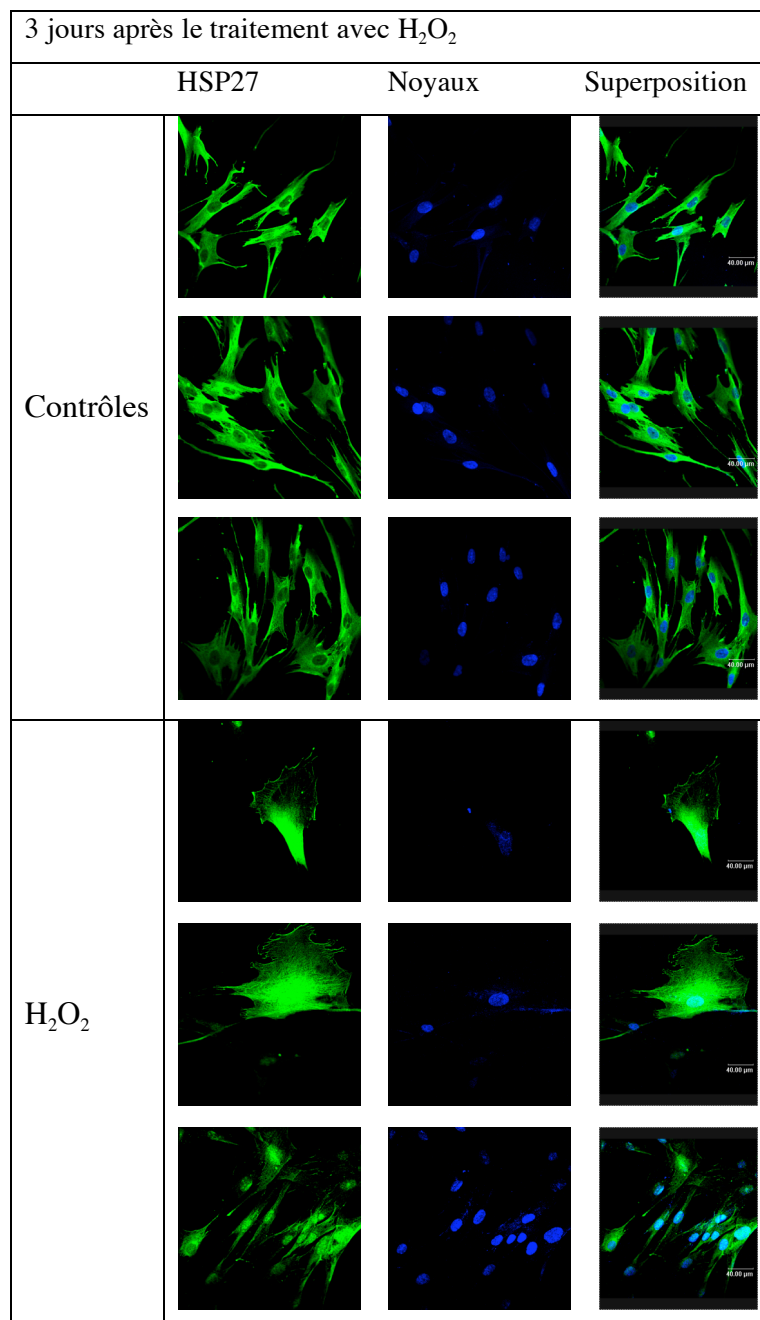


Figure 54: Effet du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ sur la localisation subcellulaire de HSP27. À 2 jours après le traitement avec H₂O₂, les cellules sont repiquées sur des couvre-objets en verre à 20.000 cellules/cm² et fixées au jour 3 après le traitement avec H₂O₂. HSP27 est immunomarkée avec des anticorps primaires polyclonaux de chèvre (détection de HSP27 de l'homme, du lapin et de la souris) et des anticorps secondaires (IgG de lapin) marqués au fluorochrome Alexa Fluor 488. Les micrographies représentatives en fluorescence sont obtenues par utilisation de la microscopie confocale semi-quantitative.

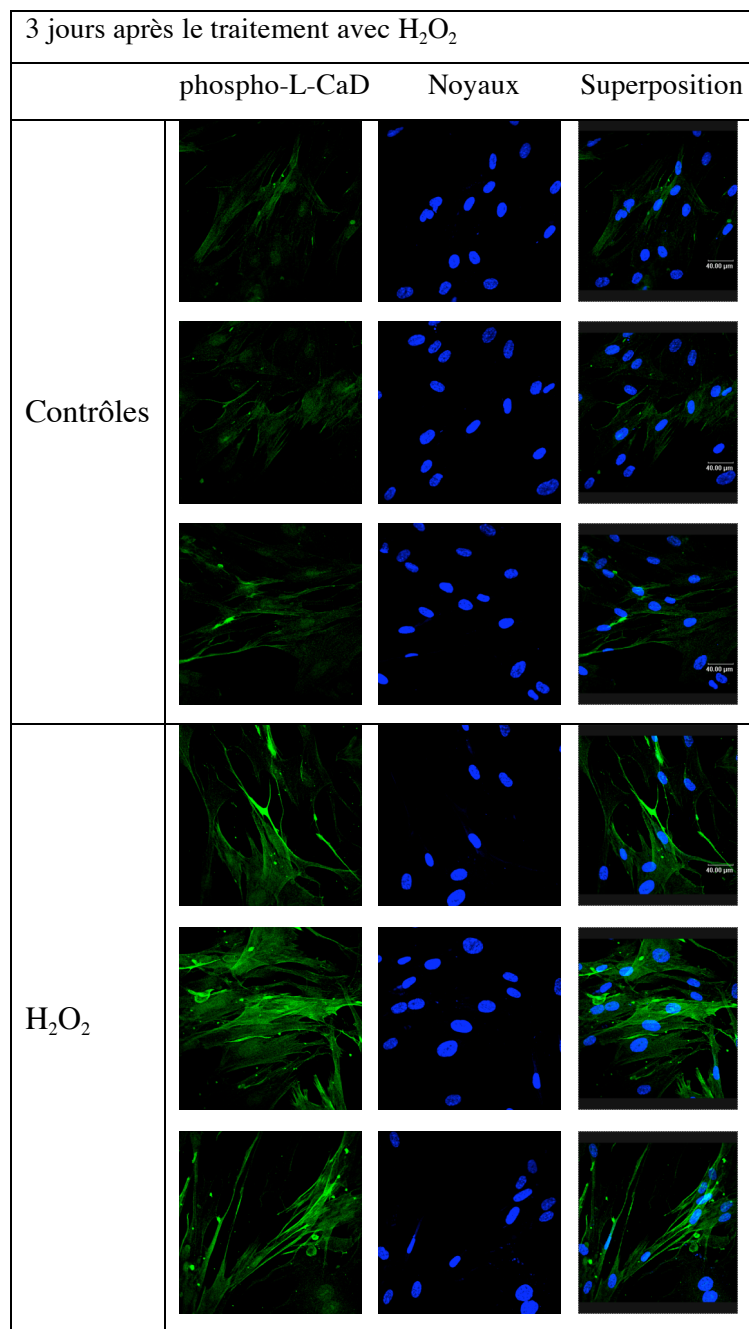


Figure 55: Effet du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ sur la localisation subcellulaire de L-CaD. À 2 jours après le traitement avec H₂O₂, les cellules sont repiquées sur des couvre-objets en verre à 20.000 cellules/cm² et fixées au jour 3 après le traitement avec H₂O₂. L-CaD est immunomarkée avec des anticorps primaires monoclonaux de souris (détection de L-CaD de l'homme, du rat et de la souris) et des anticorps secondaires (IgG de chèvre) marqués au fluorochrome Alexa Fluor 488. Les micrographies représentatives en fluorescence sont obtenues par utilisation de la microscopie confocale semi-quantitative.

I.3. Localisation subcellulaire de HSP27 lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90

Nous avons montré au cours de ce travail que HSP27 était phosphorylée uniquement dans les heures qui suivent le traitement des FDHs avec H_2O_2 . HSP27 est néosynthétisée entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après ce traitement. Nous avons étudié la localisation sub-cellulaire de cette protéine par microscopie confocale à 3 jours après le traitement des cellules. Nous présentons ici des résultats représentatifs d'expériences réalisées en triplicats (figure 54).

Nous avons montré que l'abondance totale de HSP27 ne varie pas à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Nous démontrons ici que cette protéine présente néanmoins une localisation subcellulaire différente dans les conditions contrôles ou de traitement. Elle est en effet beaucoup plus présente au niveau nucléaire ou péri-nucléaire pour les FDHs en sénescence prématurée. La localisation nucléaire ou péri-nucléaire de HSP27 a déjà été démontré pour des kératinocytes lors de l'irritation de la peau (Borrelli et al., 2002).

I.4. Localisation subcellulaire de phospho-L-CaD lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90

Nous avons mis en évidence des différences de l'abondance de phospho-L-CaD dans les temps courts et longs qui suivent le traitement des FDHs avec H_2O_2 . Il est connu que CaD s'associe avec l'actine et que la phosphorylation de CaD engendre une dissociation de ce complexe (Hai and Gu, 2006). Nous avons étudié la localisation subcellulaire de phospho-L-CaD par microscopie confocale à 3 jours après le traitement des FDHs. Nous présentons ici des résultats représentatifs d'expériences réalisées en triplicats (figure 55).

Nous observons que l'abondance de phospho-L-CaD est plus élevée chez les FDHs IMR-90 en sénescence prématurée après traitement avec H_2O_2 . Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Western blot et présentés précédemment. La localisation de phospho-L-CaD est assez diffuse à travers le cytoplasme des FDHs IMR-90 mais plus dense le long des prolongements cellulaires.

I.5. Potentiel migratoire des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée

Par leur rôle sur la réorganisation de l'actine, Cdc42 et Rac1 sont également connues pour permettre la migration cellulaire (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Si le potentiel migratoire des FDHs IMR-90 est altéré lors de la sénescence prématurée, quel pourrait être l'implication de Cdc42 et Rac1 dans de ce processus ? Nous avons réalisé des

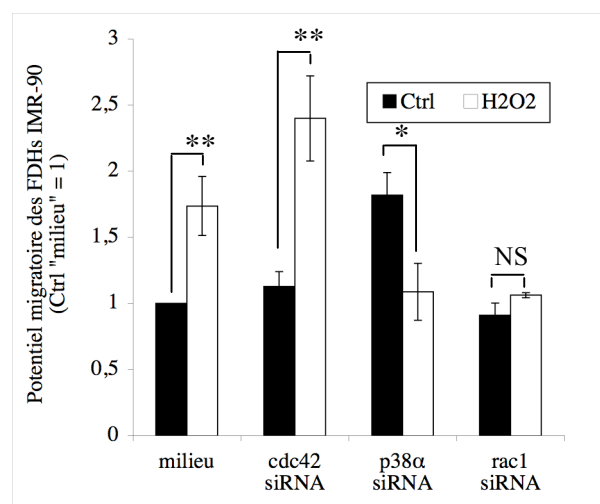


Figure 56: Effet de l'inactivation de Cdc42, p38α^{MAPK} ou Rac1 sur le potentiel migratoire des FDHs IMR-90 à 5 jours après traitement avec H₂O₂. Les FDHs IMR-90 transfectés avec les siRNA indiqués ou incubés avec du milieu seul ont été traités avec H₂O₂ (150 μM) pendant 2 h et le potentiel migratoire des FDHs IMR-90 a été analysé par utilisation de chambres de Boyden (constituées d'une cupule délimitée par une membrane de polycarbonate percée de pores de 8 μM de diamètre et déposée dans une plaque de culture cellulaire 24 puits (2 cm²/puits)). Pour les différentes conditions, les cellules (200.000 cellules/500 μl de milieu + 2 % sérum) ont été placées dans le compartiment supérieur et incubées à 37°C durant 4 h afin de permettre leur migration vers le compartiment inférieur contenant également du milieu + 2 % sérum. Les cellules ayant migré vers la partie inférieure de la chambre de Boyden ont été marquées avec de la calcéine (Calcein-AM, Molecular Probes) à 37°C et sous agitation. La fluorescence incorporée au sein des cellules a été détectée après 20 min (excitation à 485 nm – émission à 520 nm) (Fluoroskan Ascent). Les analyses ont été réalisées en triplicats et les moyennes sont présentées. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Student afin de comparer les valeurs obtenues avec celles du contrôle correspondant : NS, non significatif (P>0,05) ; *, 0,05>P>0,01 ; **, 0,01>P>0,001.

études supplémentaires afin de donner une partie de la réponse à cette question. En guise de perspective, nous avons en effet étudié le potentiel migratoire des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée à 5 jours après le traitement avec H_2O_2 ainsi que l'implication de Cdc42, Rac1 et $p38\alpha^{MAPK}$ dans ce processus de migration.

Le potentiel de migration des FDHs IMR-90 a été analysé utilisant des chambres de Boyden. Une droite d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la proportion de FDHs ayant migré. Des mises aux points ont été réalisées afin de vérifier la linéarité de migration en fonction de la quantité de cellules déposées dans l'insert ainsi que la linéarité d'incorporation de fluorescence en fonction de la quantité de cellules.

Dans un premier temps, nous avons analysé les FDHs contrôles et traités avec H_2O_2 à différents moments après ce traitement. Les résultats étant similaires à 3, 5 ou 7 jours, nous ne présentons ici que les résultats obtenus à 5 jours après le traitement (figure 56).

De manière très surprenante, les cellules en sénescence prématurée présentent un potentiel migratoire plus élevé que les cellules contrôles. Ceci n'a jamais été démontré dans le cadre de la sénescence prématurée induite par un stress avec H_2O_2 .

Nous sommes conscients que la différence observée entre les deux conditions n'est pas très élevée (moins de 2 fois), il ne faut néanmoins pas oublier que les valeurs données correspondent à un nombre de cellules et représente donc une activité fonctionnelle de ces cellules.

Ces résultats étant reproductibles et statistiquement significatifs, nous avons ensuite étudié l'effet de l'inactivation de Cdc42, Rac1 et $p38\alpha^{MAPK}$. Les résultats obtenus lors de l'inactivation de ces 3 protéines démontrent qu'elles jouent des rôles différents en ce qui concerne la migration des FDHs IMR-90. En effet, Cdc42 semble plutôt bloquer le potentiel migratoire de ces cellules en sénescence prématurée sans intervenir dans les conditions contrôles. $p38\alpha^{MAPK}$ joue un rôle inhibiteur sur la migration des cellules contrôles mais permettrait ce processus lors de la sénescence prématurée. Rac1, quant à elle participe uniquement à la migration des cellules en sénescence prématurée sans réguler ce mécanisme chez les cellules contrôles.

I.6. Surexpression de la cavéoline 1 cytoplasmique et nucléaire chez les FDHs IMR-90 et implication de la cavéoline 1 dans les mécanismes de la sénescence prématurée induite par H_2O_2

L'étude protéomique réalisée et présentée dans la première partie du travail a permis d'établir une liste de protéines présentant des variations de néosynthèse protéique à long terme (entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour) après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . D'autre part, nous

avons ciblé notre étude sur l'activation de Cdc42 et p38^{MAPK} ainsi que sur la phosphorylation de HSP27 et la L-caldesmone dès la première heure de traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Cependant les voies de signalisation mises en évidence au cours de ce travail présentent des points d'ombre. Par exemple, nous ne savons pas quel mécanisme permet à H₂O₂ d'activer p38^{MAPK} ou Cdc42. De plus, d'autres voies de signalisation interviennent certainement en parallèle et de façon indépendante de celles qui ont été présentées dans notre étude.

Afin d'approfondir ces mécanismes moléculaires, nous nous sommes tournés vers la cavéoline 1 dans la deuxième partie de notre travail. Dans le cadre de la sénescence prématurée induite par un traitement subléthal avec H₂O₂, la cavéoline 1 nous a intéressé pour plusieurs raisons. En 2002, Volonté et son équipe ont montré que cette protéine joue un rôle dans la sénescence prématurée de fibroblastes murins transformés NIH3T3 induite par H₂O₂ (Volonte et al., 2002). Les auteurs montrent que l'abondance de la cavéoline 1 augmente dans ces conditions et est impliquée dans l'augmentation de la proportion de cellules présentant une activité SA β -gal ainsi que dans le blocage du cycle cellulaire en permettant l'induction de la protéine p21^{WAF-1}. Ainsi, dans des cellules immortalisées, la surexpression de la cavéoline 1 semble suffisante pour induire le phénotype sénéscent. De plus, une étude transcriptomique menée précédemment au laboratoire montre que l'abondance des ARNm de la cavéoline 1 augmente chez les FDHs normaux WI-38 en sénescence répllicative et en sénescence prématurée induite prématurément par des stress répétés au *t*-BHP ou à l'éthanol (Pascal et al., 2005). En parallèle de ces données concernant la sénescence prématurée, la littérature révèle que Rac1 et Cdc42 peuvent interagir directement avec la cavéoline 1 et présentent une activité plus importante au sein des cavéoles lors de la sénescence répllicative de FDHs (Cho et al., 2004). L'équipe de Volonté a également montré que la phosphorylation de la cavéoline 1 est dépendante de p38^{MAPK} après un traitement des fibroblastes murins NIH3T3 avec H₂O₂ (Volonte et al., 2001). Au vu de ces données de la littérature, nous nous sommes donc demandés si la cavéoline 1 est surexprimée dans les FDHs IMR-90 en sénescence prématurée induite par une concentration subléthale de H₂O₂. Si oui, la cavéoline 1 joue-t-elle un rôle quant à l'activation de Cdc42 ou de la phosphorylation de la L-caldesmone et sa phosphorylation est-elle régulée par p38^{MAPK}?

Dans le manuscrit qui est présenté ci-après, nous étudions l'abondance en ARNm, l'abondance protéique et la localisation subcellulaire de la cavéoline 1 après traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Nous analysons ensuite l'effet de l'inactivation de la cavéoline 1 sur l'activation de Cdc42 et sur la phosphorylation de la L-caldesmone ainsi que l'effet de l'inactivation de p38^{MAPK} sur la phosphorylation de la cavéoline 1.

Title

Increased abundance of cytoplasmic and nuclear caveolin 1 in human diploid fibroblasts in H₂O₂-induced premature senescence and interplay with p38 α ^{MAPK}

Authors

Aline Chrétien, Neil Piront, Edouard Delaive, Catherine Demazy, Noëlle Ninane, Olivier Toussaint

Unit of Research on Cellular Biology, University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium

Corresponding author: O. Toussaint, Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium.

E-mail: olivier.toussaint@fundp.ac.be Phone: 003281724132 Fax: 003281724135

Keywords

H₂O₂. siRNA. Cellular senescence. Caveolin 1. Fibroblasts. Stress-induced premature senescence.

Abbreviations

BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; DTT, dithiothreitol; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HDF, human diploid fibroblast; IgG, immunoglobulin G; MAPK, mitogen-activated kinase; MEM, minimum essential medium; mRNA, messenger ribonucleic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay; NP-40, nonidet P-40; PBS, phosphate buffer saline; PCR, polymerase chain reaction; s.d., standard deviation; SA β -gal activity, senescence associated- β galactosidase activity; SDS, sodium dodecyl sulfate; siRNA, small interfering RNA; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

Introduction

Senescent human diploid fibroblasts (HDFs) obtained after serial subcultivation display typically enlarged cell shape, senescence associated β -galactosidase activity (SA β -gal), changes in the expression level of many genes and irreversible growth arrested [1-4]. HDFs treated with sublethal concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2) or *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) display markers of senescence within two or three days after the stress [5-10]. This is stress-induced premature senescence (SIPS) [11].

Caveolin 1 (Cav1) is the principal structural component of caveolae membrane domains and is a scaffolding protein able to concentrate and organize signaling molecules within the caveolae [12,13].

Both N- and C- terminal domains of Cav1 face the cytoplasm and are accessible for interactions with cytoplasmically oriented molecules [14]. Cav1 mediates the inhibition of Erk and PI3K proteins in NIH3T3 fibroblasts under cell detachment [15] or induces Akt activation in mesangial human cells in presence of H_2O_2 [16,17].

Overexpression of Cav1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts [18]. In NIH3T3 murine fibroblasts and in endothelial cells treated with H_2O_2 , p38^{MAPK} is involved in the phosphorylation of Cav1 [19,20].

We show herein that Cav1 abundance is increased in cytoplasm and nucleus of IMR-90 fetal lung HDFs in H_2O_2 -induced premature senescence. We used siRNA to down-regulate Cav1 in order to test whether Cav1 is involved in premature senescence. siRNA were used to down-regulate $\text{p38}\alpha^{\text{MAPK}}$ and to study its role in the phosphorylation of Cav1 observed during treatment with H_2O_2 .

Names	Sequences	GenBank
Cav1 forward reverse	5'- CGCACACCAAGGAGATCGA -3' 5'- GTGTCCCTTCTGGTTCTGCAAT -3'	NM_001753
GAPDH forward reverse	5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGAC -3' 5'- GTCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'	NM_002046

Table 1A: Sequences of the primers used in RT real-time PCR analysis

siGENOME SMART pool M-003467-01, Human Cav1, NM_001753	
Sense sequence 1	CUAAACACCUCAACGAUGAUU
Antisense sequence 1	5'-PUCAUCGUUGAGGUGUUUAGUU
Sense sequence 2	GCAGUUGUACCAUGCAUUAUU
Antisense sequence 2	5'-PUAAUGCAUGGUACAACUGCUU
Sense sequence 3	AUUAAGAGCUUCCUGAUUGUU
Antisense sequence 3	5'-PCAAUCAGGAAGCUCUUAUUUU
Sense sequence 4	GCAAAUACGUAGACUCGGAUU
Antisense sequence 4	5'-PUCCGAGUCUACGUAAUUGCUU

siGENOME SMART pool M-003512-05, Human MAPK14 (p38 α^{MAPK}), NM_001315	
Sense sequence 1	CAAGGUCUCUGGAGGAAUUUU
Antisense sequence 1	5'-PAAUUCCUCCAGAGACCUUGUU
Sense sequence 2	GUCAGAAGCUUACAGAUGAUU
Antisense sequence 2	5'-PUCAUCUGUAAGCUUCUGACUU
Sense sequence 3	CGGCUUAUCUCAUUAACAGUU
Antisense sequence 3	5'-PCUGUUAUGAGAUAAAGCGGUU
Sense sequence 4	GUCCAUCAUUC AUGCGAAAUU
Antisense sequence 4	5'-PUUUCGCAUGAAUGAUGGACUU

Table 1B: List of the 4 sense and antisense sequences of siRNA targeting Cav1 or p38 α^{MAPK}

Experimental procedure

Cell culture, stress and stimulation

IMR-90 human fetal lung diploid fibroblasts (HDFs) were grown in minimum essential medium (MEM) (Gibco, UK) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, UK). IMR-90 HDFs at about 50% of *in vitro* proliferative life span (27 population doublings) were seeded at a density of 24×10^3 cells / cm². One day later, cells were treated for 1 or 2 h with 150 μ M of H₂O₂ (Merck, Germany) diluted in MEM + 10% FBS. A 2 h incubation with H₂O₂ represents a sublethal treatment [6,21-23]. Controls cells were incubated in culture medium alone. After treatment, IMR-90 HDFs were washed twice with cold phosphate buffer saline pH 7.4 (10 mM phosphate, 0.9% NaCl) (PBS) and incubated with fresh MEM + 10% FBS. The appearance of biomarkers of senescence was checked (decrease of the proliferative potential and increase in SA β -gal-staining) [6,21,22] from the 2nd to the 3rd day after treatment.

RT-real time PCR

RNA extraction, choice of the sequences of primers and RT-real time PCR was performed as detailed in [22]. Sequences of the primers can be found in table 1A. The abundance of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as a reference for semi-quantification with the classical “ $\Delta\Delta C_T$ method” [24].

Western blots

Extraction of total proteins was performed as detailed in [22]. Extraction of nuclear proteins: cells were washed with PBS, scraped in hypotonic lysis buffer (Hepes 10 mM pH 7.9, KCL 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM (all from Merck, Germany), NP-40 0.5 % (Sigma Aldrich, USA), DTT 1 mM (Amersham GE Healthcare, Sweden), and protease inhibitor), passed through a loose fitting Dounce homogenizer, and centrifuged at 3,000 rpm

for 3 min. Pellet (nuclear fraction) was washed with hypotonic lysis buffer before resuspension in the same buffer and sonication.

Western blots were performed as described in [22] using these antibodies: anti-caveolin1 mouse IgG, anti-phospho-caveolin1 mouse IgG (BD Transduction Laboratories, Belgium), anti-caveolin1 rabbit IgG, anti-phospho-Akt (Ser 473) rabbit IgG, anti-Akt rabbit IgG, anti-phospho-Erk1/2 (Thr 202/Tyr 204) rabbit IgG, anti-Erk1 mouse IgG, anti-Erk2 mouse IgG, anti-phospho-L-CaD (Ser 789) rabbit IgG (Cell signaling, USA), anti-Histone H1 mouse IgG, anti-p21 mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti- α -tubulin mouse IgG (Clone B-5-1-2, Sigma Aldrich, USA) and horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (anti-mouse antibodies: Amersham GE Healthcare, Sweden). α -tubulin and Histone H1 were used as reference protein for respectively total and nuclear cell lysates analysis. Triplicates were performed.

Confocal microscopy

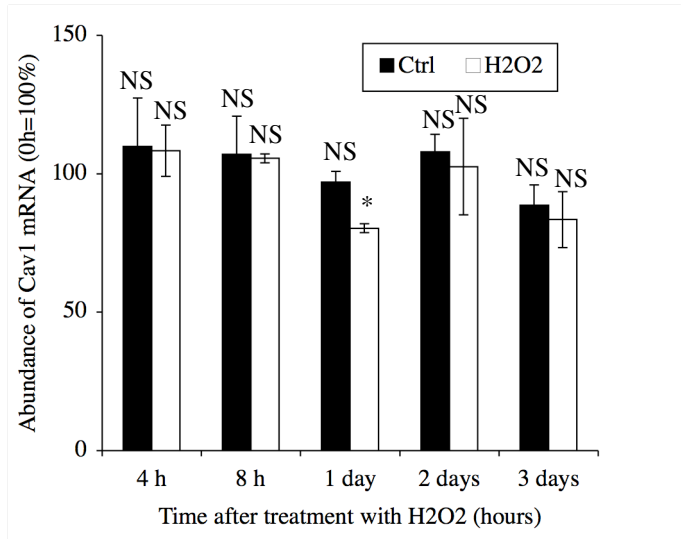
Cells were seeded at 20,000 cells/cm² in MEM + 10 % FBS on a glass cover slide. One day later, cells were fixed with paraformaldehyde 3 % (Sigma Aldrich, USA). Cells were permeabilized with triton X-100 1 %. Specific mouse antibody Cav1 was added followed by the specific Alexa Fluor 488 anti-mouse conjugate antibody (Molecular Probes, USA). To visualize the nucleus, cells were incubated with TO-PRO-3 (ICN, USA)). The glass cover slides were mounted in Mowiol (Sigma, USA) and observed with a TCS confocal microscope (Leica, Germany) at constant multiplier. Triplicates were performed.

siRNA transfection

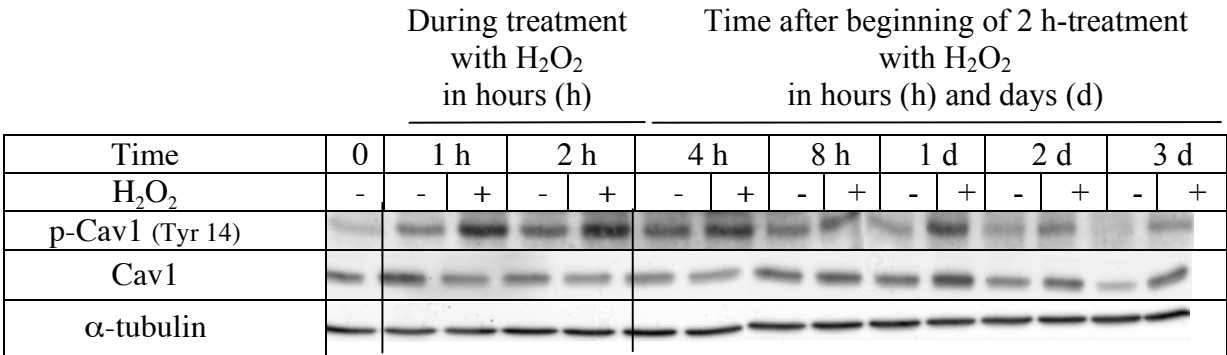
The siGENOME SMARTpool siRNA reagent M-003467-01 or M-003512-05 from Dharmacon (Belgium) were used to down-regulate the expression of Cav1 and p38 α ^{MAPK}, respectively. The sequences of siRNA are provided (table 1B) and are guaranteed by the manufacturer. Non-targeting oligoribonucleotides (OR-0030-neg, Eurogentec, Belgium) were

used as negative control. IMR-90 HDFs were seeded at half-confluency (20×10^3 cells / cm^2). One day later, the cells were transfected for 36 h, starting at day -3 before treatment with H_2O_2 , with siRNA at 50 nM in MEM medium using Dharmafect transfection reagent. Cells were plated at day -1 before treatment with H_2O_2 (figure 2A). Cell viability was evaluated using the classical 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay (MTT) (Sigma Aldrich, Germany) [25].

A Cav1 mRNA abundance



B Cav1 and p-Cav1 protein abundance



C

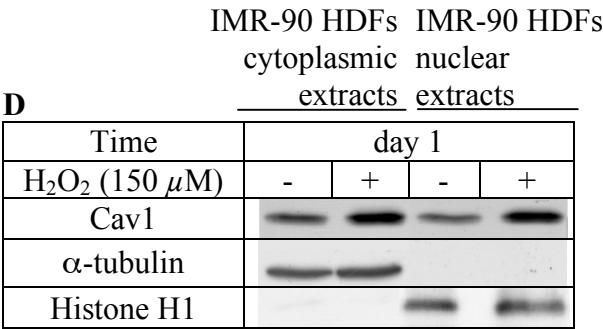
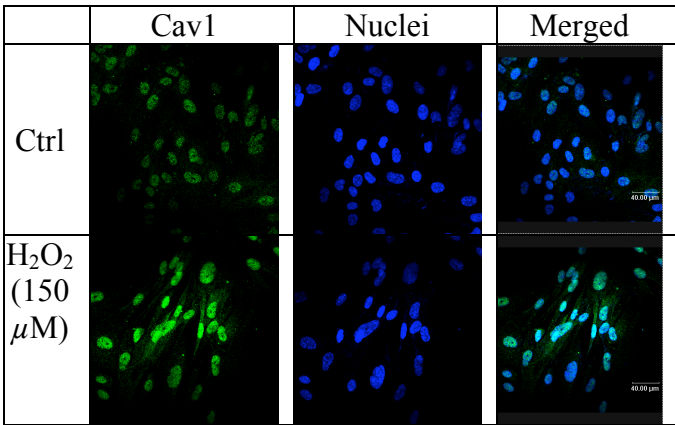


Figure 1: Effect of a treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ at 150 μ M for 2 h on Cav1 mRNA abundance, protein abundance, and subcellular localization.

A: Cav1 mRNA abundance at increasing times after treatment with H₂O₂. The abundance of GAPDH mRNA was used as a reference. The results are expressed in percentages of control cells before treatment and are given as the mean \pm s.d. of three independent experiments. As for statistical analysis, a student's *t*-test has been performed. NS, non significant ($P < 0.05$); *, $0.05 > P > 0.01$.

B: phospho-Cav1 and Cav1 protein abundance at increasing times after treatment with H₂O₂. α -tubulin protein abundance was used as loading control. Analyses were performed in three independent experiments. Representative results are shown.

C: Analysis of subcellular localization of Cav1. IMR 90-HDFs were treated for 2 h with H₂O₂ at 150 μ M and were fixed 3 days later and the Cav1 subcellular localization was detected using a specific antibody (green). The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue).

D: Analysis of Cav1 cytoplasmic and nuclear protein abundance. IMR 90-HDFs were treated for 2 h with H₂O₂ at 150 μ M. Total proteins or nuclear proteins were extracted at 1 day after the treatment from control and treated cells. α -tubulin or histone H1 were used as loading control respectively for cytoplasmic or nuclear extracts. Analyses were performed in three independent experiments. Representative results are shown.

Results

Increased abundance of total and phosphorylated Cav1 after treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ at sublethal concentration

IMR-90 HDFs were treated for 2 h with H₂O₂ at 150 μ M. This represents a sublethal treatment as shown earlier [5,6,21]. After the treatment with H₂O₂ at day 0, the cells exhibited a decrease of proliferative potential from day 2 to 3 and an increase in proportion of cells stained positive for SA β -gal at 3 days after the treatment, indicating that the cells underwent senescence [1,6,21,22](data not shown).

No difference for Cav1 mRNA abundance could be detected by RT-real time PCR from 4 h to 3 days after the 2 h-treatment with H₂O₂, except a slight decrease at one day after treatment (figure 1A). As for Cav1 total protein abundance, Western blots showed an increase from 1 day to 3 days after treatment with H₂O₂, compared to non-treated controls (figure 1B). From day 1 to day 3 after the treatment with H₂O₂, the phospho-Cav1 abundance increased in parallel to the total abundance of Cav1. Independently of these variations, H₂O₂ induced the phosphorylation of Cav1 after 1 and 2 h of treatment and for 8 h after treatment with H₂O₂, compared with non-treated controls.

Nuclear localization of Cav1 in IMR-90 HDFs

Cav1 is often described as a plasma membrane protein [26]. We analyzed the subcellular localization of Cav1 at day 1 and 2 after H₂O₂ treatment. Surprisingly, the analysis of immuno-labeled Cav1 showed a cytoplasmic and a nuclear localization in IMR-90 HDFs (figure 1C). An increase in the protein abundance was also observed, confirming the Western blots analysis presented at figure 1B.

To confirm the localization of Cav1, we analyzed cytoplasmic and nuclear extracts by Western blot. Cav1 was found in both cytoplasm and in nucleus (figure 1D). H₂O₂ treatment

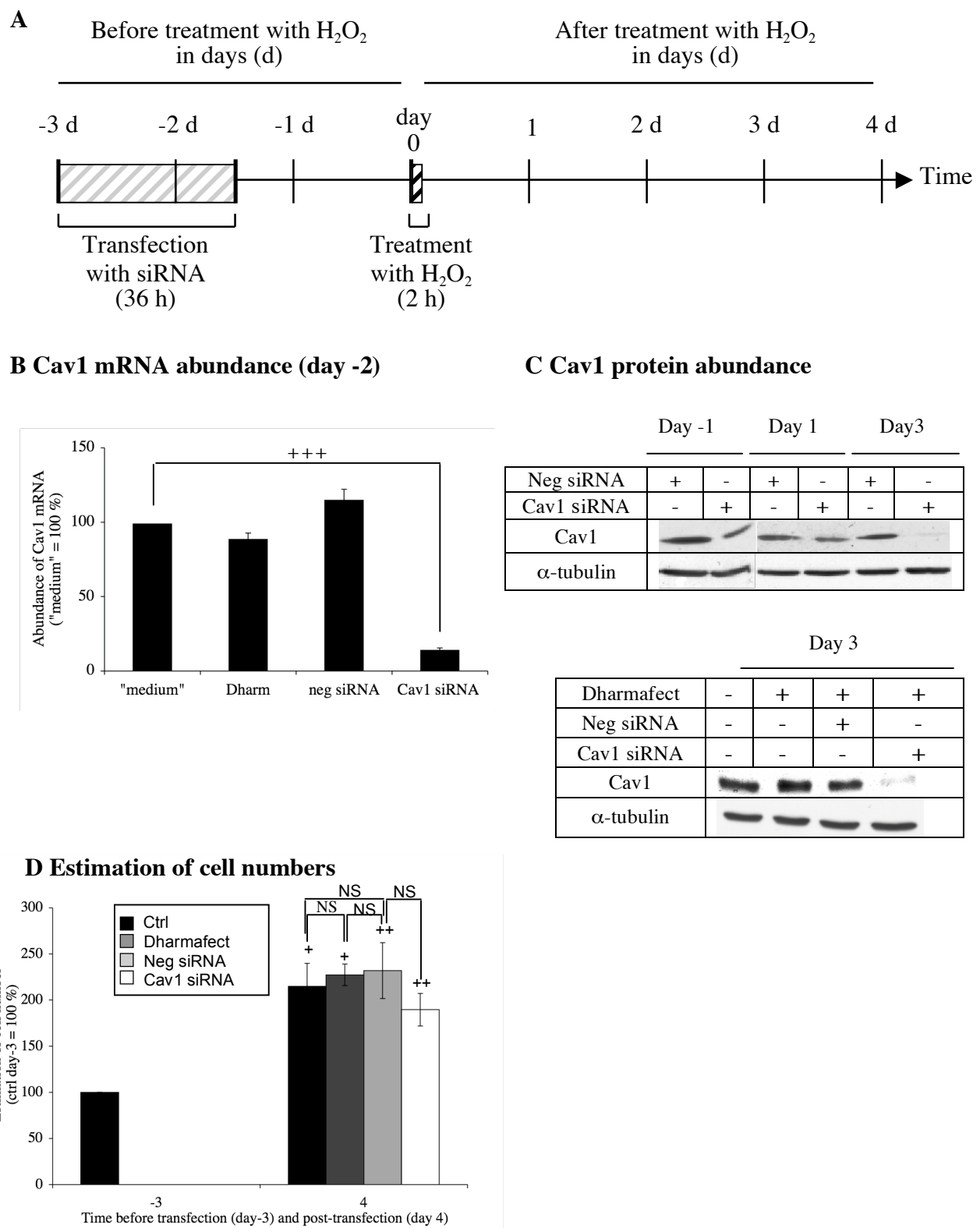


Figure 2: Specific silencing of Cav1 siRNA and effect of siRNA transfection on the viability of IMR-90 HDFs.

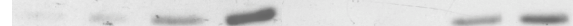

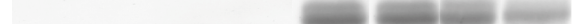
A: Schematic representation of the experimental schedule for IMR-90 HDFs transfection with siRNA and treatment with H_2O_2 .

B: mRNA abundance of Cav1 in IMR-90 HDFs transfected with 50 nM siRNAs targeting Cav1 or with negative siRNA. IMR-90 HDFs incubated with Dharmafect (Dharm) or with medium alone ("medium") were also analyzed. Total RNA was extracted at 1 day after transfection. GAPDH mRNA abundance was used as a reference. The results are expressed in percentages of the values found in control "medium" and are presented as the mean \pm s.d. from three independent experiments. As for statistical analysis, a Student's *t*-test was performed to compare values with the control medium: +++, $P < 0.001$.

C: Western-blot analysis of IMR-90 HDFs cell lysates transfected with 50 nM siRNAs targeting Cav1 or with negative siRNA. Proteins were extracted at day -1, 1 or 3. IMR-90 HDFs incubated with Dharmafect (Dharm) were also analyzed at day 3. α -tubulin protein abundance was used as loading control. Analyses were performed in three independent experiments. Representative results are shown.

D: IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNA, incubated with Dharmafect (Dharm) or incubated with medium alone for 36 h. MTT assay was performed before transfection at day -3 and at day 4. The results are expressed in percentages of the values found in control cells before transfection (day -3) and are given as the mean \pm s.d. from three independent experiments. Statistical analysis was performed with the Student's *t*-tests either to compare the values with the control before transfection (day -3): +, $0.05 > P > 0.01$; ++, $0.01 > P > 0.001$ or to compare values with the controls transfection at day 4: NS, non significant ($P > 0.05$).

A

	IMR-90 HDFs cytoplasmic extracts				IMR-90 HDFs nuclear extracts			
Time	Day 1							
H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
siRNA Cav1	+	+	-	-	+	+	-	-
Cav1								
Histone H1								
α -tubulin								

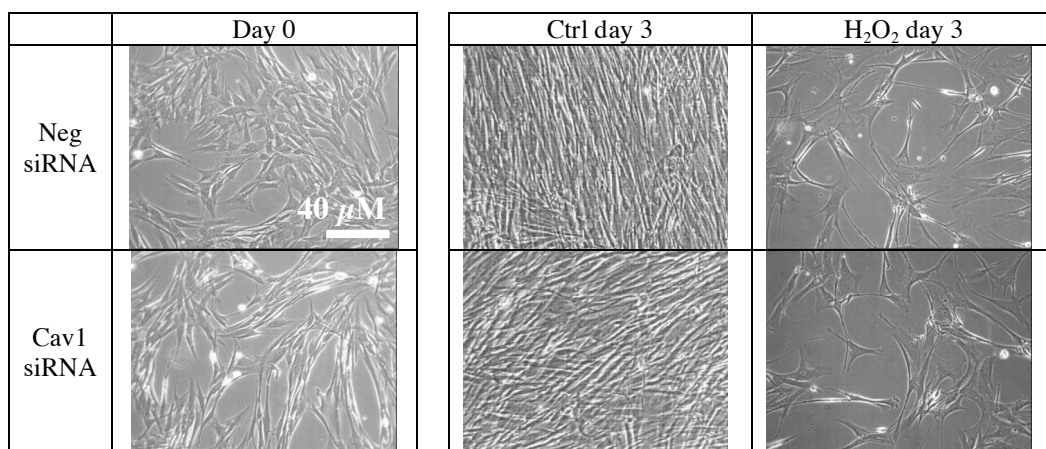
B IMR-90 HDFs morphology

Figure 3: A: Western-blot analysis of total or nuclear lysates of IMR-90 HDFs transfected with 50 nM siRNAs targeting Cav1 or incubated with medium alone.

Proteins were extracted at day 1 and α -tubulin or histone H1 were used as loading control respectively for total cell or nuclear extracts. Analyses were performed in three independent experiments. Representative results are shown.

B: Morphology of IMR-90 HDFs before treatment with H₂O₂ (day 0) and at day 3 after the 2 h-treatment with H₂O₂. IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNA for 36 h. Representative micrographs of IMR-90 HDFs in phase-contrast microscopy are shown.

increased the abundance of Cav1 in the nuclear and cytoplasmic extracts. α -tubulin was used as cytoplasmic protein marker and was absent in the purified nuclear extracts. Histone H1 was detected as nuclear marker and was not detected in the cytoplasmic extracts. These results were obtained with two different anti-Cav1 specific antibodies directed towards different antigenic areas of Cav1 sequence. To our knowledge, this is the first time that nuclear localization of Cav1 is reported in human fibroblasts. The siRNA analysis presented beneath further confirmed these results.

Down-regulation of Cav1 expression

Since Cav1 is overexpressed after treatment with H_2O_2 and thus potentially regulates premature senescence, we used specific siRNA to down-regulate Cav1 expression and studied the potential effects of this down-regulation on H_2O_2 -induced premature senescence. The experimental procedure is depicted in figure 2A. Cav1 mRNA abundance decreased by $90.6 \pm 5.9 \%$ or by $96.8 \pm 5.5 \%$ compare to cells before the transfection at 2 days or 4 days after the beginning of transfection (day -1 or day 1 in figure 2A) (figure 2B). However, 6 days after the beginning of the transfection (day 3 in figure 2A) were necessary before Cav1 protein vanished (figure 2C). Transfection of IMR-90 HDFs with Cav1 siRNA did not significantly reduce the cell number at 6 days after the beginning of the transfection (day 4 in figure 2A), which suggests absence of cell death after transfection (figure 2D). Then, we treated cells with H_2O_2 at day 3 after transfection. In presence of Cav1 siRNA, no Cav1 protein could be detected neither in cytoplasmic nor in nuclear extracts after treatment with H_2O_2 or not (figure 3A). These results were obtained with two specific antibodies anti-Cav1 directed towards different antigenic areas of Cav1 sequence. These observations after down-regulation of Cav1 with siRNA confirmed that the protein detected in the nuclear extracts is indeed Cav1.

Cav1 siRNA does not alter premature senescence of HDFs

		“Medium”	Dharm	siRNA neg	siRNA Cav1
A	[³ H]-thymidine incorporation (% of control)	25% ± 12%	21% ± 7%	21% ± 5%	23% ± 8%
B	SA β-gal activity (fold-increase of positive cells) (Ctrl: 10 ± 2.9%)	5.2 ± 2.6	5.1 ± 1.5	3.5 ± 0.5	3.2 ± 0.0
C	p21 ^{WAF-1} mRNA abundance (fold-increase)	10.3 ± 0.8	4.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	7.2 ± 2.7
D	TGF-β1 mRNA abundance (fold increase)	2.3 ± 0.8	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.5

Table 2: Effect of Cav1 down-regulation on markers of premature senescence induced by H₂O₂. At day -3, IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNA, incubated with Dharmafect (Dharm) or with medium alone (“medium”) for 36 h. Cells were treated with H₂O₂ at 150 μM for 2 h at day 0.

A: Estimation of proliferative potential of IMR-90 HDFs: incorporation of [³H]-thymidine (1 μCi/ml) into DNA was measured between the day 2 and 3. Data were reported to protein abundance obtained before incubation with [³H]-thymidine. Then, the results are reported to control cells (“medium”). Percentages between control and treated cells are given as the mean ± s.d. from 3 independent experiments.

B: Proportion of cells positive for SA β-gal activity was determined at day 3. The ratios between control and treated cells are given as the mean ± s.d. from 3 independent experiments.

C and D: p21^{WAF-1} and TGF-β1 mRNA abundance estimated at day 1. The abundance of GAPDH mRNA was used as reference. The results are reported to the control cells before the transfection and ratios between control and treated cells are given as the mean ± s.d. from 3 independent experiments.

A. Effect of p38 α ^{MAPK} siRNA on total and phospho-Cav1 abundance after 1 h of treatment with H₂O₂

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
p38 ^{MAPK} siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
neg siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
p38 ^{MAPK}								
p-Cav1 (tyr 14)								
Cav1								
α -tubulin								

B. Effect of H₂O₂ on Akt, Erk, p-Akt and p-Erk protein abundance

Time after beginning of 2 h-treatment with H₂O₂ in hours (h) and days (d)

Time	8 h		1 day		2 days		3 days	
H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
p-Akt (Ser 473)								
Akt								
p-Erk (Thr 202/Tyr 204)								
Erk								
α -tubulin								

C. Effect of Cav1 siRNA on p-Erk and p21^{WAF-1} protein abundance at day 1 after treatment with H₂O₂

H ₂ O ₂	-	+	-	+	-	+	-	+
Cav1 siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+
neg siRNA	-	-	-	-	+	+	-	-
Dharmafect	-	-	+	+	-	-	-	-
Cav1								
p21 ^{WAF-1}								
α -tubulin								

Figure 4: A: Effect of p38 α ^{MAPK} down-regulation with siRNA on phospho-Cav1 and Cav1 protein abundance during treatment with H₂O₂. IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNA, incubated with Dharmafect (Dharm) or with medium alone. Proteins were extracted after a 1 h-treatment with H₂O₂. B: Effect of a treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂ at 150 μ M for 2 h on total and phosphorylated Akt and Erk protein abundance at increasing times after treatment with H₂O₂. α -tubulin protein abundance was used as loading control. Analyses were performed in three independent experiments. Representative results are shown.

C: Effect of Cav1 down-regulation with siRNA on p21^{WAF-1} protein abundance after treatment with H₂O₂. IMR-90 HDFs were transfected with indicated siRNAs, incubated with Dharmafect (Dharm) or with medium alone. Proteins were extracted at day 1 after the 2 h-treatment with H₂O₂. α -tubulin protein abundance was used as a loading control. Analyses were performed in three independent experiments, representative results are shown.

Cav1 was described to affect the morphology and growth arrest of NIH3T3 murine fibroblasts treated with H₂O₂ [18]. Since Cav1 total abundance and phospho-Cav1 abundance increased after treatment with H₂O₂, we investigated whether Cav1 was involved in premature senescence in IMR-90 HDFs. At 3 days after treatment with H₂O₂ at sublethal concentration, IMR-90 HDFs showed a senescent-like morphology (figure 3B) [5,6,27]. Cav1 down-regulation did not block this morphological change (figure 3B) nor the actin and paxillin distribution normally seen after the treatment (data not shown) [27].

Cav1 down-regulation did not alter the sharp decrease in [³H]-thymidine incorporation into DNA, nor the increase in the proportion of SA β-gal positive HDFs, all normally observed after treatment with H₂O₂ at sublethal concentration. The representative results are detailed in table 2.

Activation of the p38^{MAPK} pathways is required to induce the tyrosine phosphorylation of Cav1

p38^{MAPK} is phosphorylated during treatment of IMR-90 with H₂O₂ [21,22]. In murine NIH3T3 fibroblasts, tyrosine phosphorylation of Cav1 after treatment with H₂O₂ at 5 mM for 20 min is reversible and dependent on p38^{MAPK} and c-Src kinase [19]. We investigated the involvement of p38^{MAPK} protein in the abundance of phosphorylated Cav1 during treatment of IMR-90 HDFs with sublethal concentration of H₂O₂ (figure 4A). p38^{MAPK} down-regulation decreased the abundance of phospho-Cav1 without change in the total amount of Cav1.

In other *in vitro* human models, Cav1 can induce the phosphorylation of Akt and Erk [15]. Thus, we checked whether phosphorylation of Akt and Erk is observed after sublethal treatment of IMR-90 HDFs with H₂O₂. The phosphorylation of Erk and Akt increased from 8 h to 3 days after treatment with H₂O₂ compared to control cells, without change in the total abundance of these proteins (figure 4B). Cav1 siRNA did not alter the change of abundance

of phospho-Akt and phospho-Erk after treatment with H_2O_2 (data not shown). In presence of Cav1 siRNA, the abundance of p21^{WAF-1} was still sharply increased at 1 day after treatment with H_2O_2 (figure 4C). This is interesting since it has been described that overexpression of Cav1 leads to overexpression of p21^{WAF-1} in NIH3T3 fibroblasts, which is reduced in presence of Cav1 anti-sense oligonucleotides [18].

Discussion

Treatment of IMR-90 HDFs with a sublethal concentration of H_2O_2 induces premature senescence. $p38^{MAPK}$ is activated in IMR-90 HDFs by a sublethal concentration of H_2O_2 [6]. Nothing has been published so far as for a role of Cav1 in premature senescence of normal HDFs. We showed that the abundance of phosphorylated Cav1 is increased during treatment with H_2O_2 and for at least 3 days after treatment with H_2O_2 while total Cav1 abundance is increased from 1 to 3 days after treatment. In HDFs, in contrast to NIH3T3 murine cells, Cav1 did not seem to regulate cell survival, irreversible growth arrest, increase of percentage of SA- β gal positive cells, increase abundance of $p21^{WAF-1}$ mRNA and protein, increased of TGF- β 1 mRNA abundance, activation of Erk1/2 and Akt, nor senescent morphogenesis observed in H_2O_2 -induced premature senescence. We demonstrated that $p38\alpha^{MAPK}$ is involved in the phosphorylation of Cav1 after a 1 h of treatment with H_2O_2 . Other studies revealed that this H_2O_2 -induced Cav1 phosphorylation was reversible upon H_2O_2 withdrawal. In contrast, we showed that the phosphorylation of Cav1 is sustained after the 2 h-treatment of IMR-90 HDFs with H_2O_2 . Even if Cav1 is not increased in short times after the H_2O_2 treatment, the phosphorylation status represent a important changes that could allow this protein to be involved in the activation or inhibition of numerous mechanisms occurring after this treatment.

The major finding of this study is that Cav1 can be localized in the nucleus of HDFs as evidence by immunofluorescence, Western blot, cells fractionation and siRNA experiments. We did not find a putative nuclear localization signal in the Cav1 sequence. However, it has already been demonstrated that Cav1 can be localized in the nucleus of ovarian carcinoma cells in association with nuclear matrix and chromatin, as well as in endothelial cells in association with receptors internalized through caveolae-mediated endocytosis [28-30]. In

ovarian carcinoma cells, Cav1 appears to bind promoter sequences of genes required for proliferation, such as cyclin D1 and to negatively regulate the transcription of cyclin D1 [28]. However, cyclin D1 mRNA increases in replicative senescence and in UVB-induced premature senescence of HDFs [31-34]. Cav1 could regulate the transcription of others genes in IMR-90 HDFs. It has been hypothesized that soluble Cav1 embedded in a lipid particle can enter the cytoplasm [35]. Cav1 charged with cholesterol and detached from caveolae might translocate to the nucleus simply by diffusion or in association with a chaperone protein. Indeed, the Cav1 carboxy-terminal peptide (aa 135-150) shows sequence similarity to the third helix of the homeodomain consensus sequence, such as transcription factors HOXA-5, to diffuse through all cell membranes [36,37]. Alternatively, Cav1 might be retro-transported to the nucleus through association with vesicles or lipid droplets moving along microtubules toward their minus-ends driven by the dynein molecular motor [38].

Acknowledgements

Aline Chrétien is a recipient of a FRIA fellowship, Belgium. O. Toussaint is Research Associate of the FNRS, Belgium. We thank Dr. Béatrice Rayet for critically reading the manuscript. We acknowledge the Région Wallonne/FSE for the First-Europe projects 'Arrayage' and 'CosmUV', the First-DEI project 'Cosmet-X', and the 'Réseaux II Senegene' and 'Nanotoxico' projects. We also thank the European Commission for the Integrated projects Geha (LSHM-CT-2004-503270) and Proteomage (LSHM-CT-2005-518230); Coordination Action Link-Age (LSHM-CT-2005-513866); and « Matiss » Marie Curie Project (MTKI-CT-2006-042768).

References

- [1] Dimri, G.P. et al. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7.
- [2] Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5112-6.
- [3] Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998) *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 43-80.
- [4] Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000) *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 72-6.
- [5] Chen, Q. and Ames, B.N. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4130-4.
- [6] Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) *J Biol Chem* 276, 2531-7.
- [7] Zdanov, S., Debacq-Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2006) *FEBS Lett* 580, 6455-63.
- [8] Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M. and Toussaint, O. (2002) *Biochem Pharmacol* 64, 1011-7.
- [9] Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chretien, A., Bastin, C., Dabee, A.F., Bertholet, V., Remacle, J. and Toussaint, O. (2005) *FEBS Lett* 579, 3651-9.
- [10] Dumont, P. et al. (2000) *Free Radic Biol Med* 28, 361-73.
- [11] Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H. and Toussaint, O. (2000) *Embo J* 19, 1929-34.
- [12] Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C. and Lisanti, M.P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9407-11.
- [13] Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) *J Biol Chem* 273, 5419-22.
- [14] Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1993) *Embo J* 12, 1597-605.
- [15] del Pozo, M.A., Balasubramanian, N., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Grande-Garcia, A., Anderson, R.G. and Schwartz, M.A. (2005) *Nat Cell Biol* 7, 901-8.
- [16] Shack, S., Wang, X.T., Kokkonen, G.C., Gorospe, M., Longo, D.L. and Holbrook, N.J. (2003) *Mol Cell Biol* 23, 2407-14.
- [17] Zhang, B., Peng, F., Wu, D., Ingram, A.J., Gao, B. and Krepinsky, J.C. (2007) *Cell Signal* 19, 1690-700.
- [18] Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P. and Galbiati, F. (2002) *Mol Biol Cell* 13, 2502-17.
- [19] Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R.G. and Lisanti, M.P. (2001) *J Biol Chem* 276, 8094-103.
- [20] Chen, D.B., Li, S.M., Qian, X.X., Moon, C. and Zheng, J. (2005) *Biol Reprod* 73, 761-72.
- [21] Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) *Free Radic Biol Med* 33, 1334-46.
- [22] Chretien, A. et al. (2008) *Free Radic Biol Med*, in press.
- [23] Chretien, A., Delaive, E., Dieu, M., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Toussaint, O. (2008) *Experimental Gerontology*, in press.
- [24] Pfaffl, M.W. (2001) *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- [25] Mosmann, T. (1983) *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- [26] Williams, T.M. and Lisanti, M.P. (2004) *Genome Biol* 5, 214.
- [27] Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T. (2000) *J Cell Sci* 113 (Pt 22), 4087-97.

- [28] Sanna, E., Miotti, S., Mazzi, M., De Santis, G., Canevari, S. and Tomassetti, A. (2007) *Exp Cell Res* 313, 1307-17.
- [29] Gobeil, F., Jr. et al. (2003) *J Biol Chem* 278, 38875-83.
- [30] Feng, Y., Venema, V.J., Venema, R.C., Tsai, N. and Caldwell, R.B. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 256, 192-7.
- [31] Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T. and Ide, T. (1995) *Mech Ageing Dev* 81, 139-57.
- [32] Berardi, P., Meyyappan, M. and Riabowol, K.T. (2003) *J Biol Chem* 278, 7510-9.
- [33] Debacq-Chainiaux, F. et al. (2005) *J Cell Sci* 118, 743-58.
- [34] Borlon, C., Debacq-Chainiaux, F., Hinrichs, C., Scharffetter-Kochanek, K., Toussaint, O. and Wlaschek, M. (2007) *Exp Gerontol* 42, 911-23.
- [35] Liu, P., Rudick, M. and Anderson, R.G. (2002) *J Biol Chem* 277, 41295-8.
- [36] Joliot, A., Trembleau, A., Raposo, G., Calvet, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A. (1997) *Development* 124, 1865-75.
- [37] Uittenbogaard, A., Ying, Y. and Smart, E.J. (1998) *J Biol Chem* 273, 6525-32.
- [38] Gross, S.P. (2004) *Phys Biol* 1, R1-11.

II. Etude de la variation d'abondance des protéines membranaires ou associées aux membranes lors de la sénescence prématurée par un traitement sublétal avec H₂O₂.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que le TGF- β 1 n'est pas la seule protéine régulant l'établissement de la sénescence prématurée induite par un stress avec H₂O₂. Nous avons en effet mis en évidence la néosynthèse de protéines, entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement avec H₂O₂ lorsque les FDHs IMR-90 sont incubés avec un anticorps neutralisant le TGF- β 1. Certaines de ces protéines jouent un rôle dans la stabilisation du cytosquelette d'actine. Nos résultats suggèrent qu'il existe un lien entre p38 α ^{MAPK} et Cdc42 à 1 h après le début du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Nous avons également montré que la cavéoline 1 est surexprimée à la fois dans le cytosol et dans les noyaux essentiellement 1 jour après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. L'augmentation de la phosphorylation de la cavéoline 1 a été montrée dépendante de p38^{MAPK}.

Néanmoins, l'étude protéomique présentée précédemment ne renseigne que sur une série de protéines, essentiellement hydrophiles, présentes au sein des FDHs IMR-90 après le traitement avec H₂O₂. Le protéome d'une culture cellulaire à un moment précis est cependant beaucoup plus complexe. Nous avons donc décidé d'entreprendre une seconde étude protéomique afin de nous tourner vers les variations d'abondance de protéines plus hydrophobes que les protéines étudiées lors de la première étude protéomique.

Au cours de cette troisième partie du travail, nous nous sommes focalisés sur les protéines membranaires ou associées aux membranes qui présentent des variations d'abondance à 3 jours après le traitement avec H₂O₂. En effet, par sa localisation, cette classe de protéines joue un rôle important dans la signalisation cellulaire, le contact entre cellules ou encore le transport de molécules entre la cellule et son milieu extra-cellulaire et inversement. Cependant, malgré leur rôle dans de tels processus biologiques, les protéines membranaires sont techniquement difficiles à analyser. Ceci est lié à leur nature à la fois hydrophile et hydrophobe, leur faible niveau de solubilisation et leur faible abondance (Rabilloud, 2003). Dans un premier temps, nous avons donc réalisé les mises au point nécessaires à l'extraction de protéines membranaires ou associées aux membranes. Ensuite, nous avons utilisé la technique de marquage de protéines à l'aide de cyanines fluorescentes afin de visualiser sur gels à deux dimensions uniquement les protéines qui présentent une variation de niveau d'abondance à 3 jours après le traitement des FDHs IMR-90

avec H₂O₂. Ces résultats permettent donc de nous tourner vers des protéines plus hydrophobes que les protéines étudiées lors de la première étude et ainsi de compléter la liste des candidats impliqués dans l'établissement de la sénescence prématurée. Parmi les protéines identifiées, nous nous tournerons vers l'annexine A2 car cette protéine peut être localisée en membrane plasmique et pourrait être responsable du recrutement en membrane d'autres protéines, comme Rac1. Dans l'article suivant, nous présentons les résultats obtenus au cours de cette analyse.

Le matériel supplémentaire de cet article est présenté à la page 118 du manuscrit.

La table S2 du matériel supplémentaire concernant les données obtenues en spectrométrie de masse est présentée en annexe 2 à la page 244 du manuscrit.

Short Report

Upregulation of annexin A2 in H₂O₂-induced premature senescence as evidenced by 2D-DIGE proteome analysis

Aline Chrétien, Edouard Delaive, Marc Dieu, Catherine Demazy, Noëlle Ninane, Martine Raes, Olivier Toussaint *

Unit of Research on Cellular Biology, University of Namur (FUNDP), Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium

Received 5 November 2007; received in revised form 7 December 2007; accepted 8 January 2008

Available online 18 January 2008

Abstract

Human diploid fibroblasts undergo premature senescence after treatment with sublethal concentration of H₂O₂. We report the first proteomic study of microsomal proteins in the context of H₂O₂-induced premature senescence by using 2D-DIGE approach. Twelve different proteins with altered abundance at day 3 after treatment with H₂O₂ were identified. Among them, we demonstrated a re-localization of annexin A2 in plasma membrane.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: H₂O₂; Senescence; Fibroblasts; Proteomics; Membrane; Annexin**1. Introduction**

At 72 h after treatment with oxidative agents like H₂O₂ at subcytotoxic concentration, normal human diploid fibroblasts (HDFs) undergo stress-induced premature senescence (SIPS) (Brack et al., 2000). A proteomic analysis based on 2-dimensions gel electrophoresis (2DGE) was previously performed on total cell extracts to identify proteins involved in *tert*-butylhydroperoxide- and ethanol-induced premature senescence of HDFs (Dierick et al., 2002a,b), showing that SIPS can be studied by proteomic analyses. Proteins can also be pre-fractionated based namely on subcellular location, isoelectric point and/or molecular weight, etc. Pre-fractionation

allows enrichment of the selected proteins (Bae et al., 2003). Membrane proteins are technically difficult to analyze due to their dual hydrophilic and hydrophobic nature, intrinsic low solubilisation level and generally low abundance (Rabilloud, 2003). In order to gain more insight into the changes of membrane proteins abundance potentially taking place in SIPS, we wished to study the proteome of microsomes of IMR-90 HDFs in H₂O₂-induced premature senescence using two-dimensional difference in gel electrophoresis (2D-DIGE).

2. Materials and methods*2.1. Cell culture, stress and stimulation*

IMR-90 fetal lung HDFs (ATCC) were grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco). Premature senescence was induced by a 2-h treatment with 150 μM of H₂O₂ (Merck) diluted in MEM + 10% FBS, as previously described (Frippiat et al., 2001).

Abbreviations: 2DGE, 2-dimensions gel electrophoresis; DTT, dithiothreitol; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HDF, human diploid fibroblast; IgG, immunoglobulin G; MEM, minimum essential medium; mRNA, messenger ribonucleic acid; NP-40, nonidet P-40; O.D., optical density; SA β-gal, senescence associated-β galactosidase activity.

* Corresponding author. Tel.: +32 81724132; fax: +32 81724135.

E-mail address: olivier.toussaint@fundp.ac.be (O. Toussaint).

2.2. Microsomal proteins isolation

IMR-90 HDFs were washed and harvested in cold PBS pH 7.4, with sucrose/imidazol buffer (imidazol 3 mM pH 7.5 (Merck), sucrose 17 mM). Cells were homogenized in a Dounce homogenizer. Lysates were fractionated by differential centrifugation at 1700; 25,000; and 40,000 rpm, respectively, to pellet nuclear, mitochondria/lysosomal and microsomal fractions. Enriched microsomes fractions were resuspended in ASB-14 buffer (ASB-14 10% (Amersham GE Healthcare), Tris 5 mM (Merck)), and sonicated. Samples were diluted 5-fold with a DIGE Labeling buffer (Triton X-100 2.5%, urea 7 M, thiourea 2 M, Tris 30 mM, pH 8.5). Insoluble material was removed by centrifugation at 13,000 rpm. Microsomal proteins were isolated from three independent experiments with control and prematurely senescent IMR-90 HDFs.

2.3. 2D-DIGE

Proteins from microsomal fractions were labeled with the CyDyes DIGE fluors developed for fluorescence in 2D DIGE technology (supplementary (S) Fig. S1). The first dimension separation was done with Immobiline DryStrips providing a continuous pH 3–11 gradient. Isoelectric focusing (IEF) was performed on an IPGphor isoelectric focusing system (Amersham GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Gels were scanned with Typhoon 9400 imager in fluorescence mode to visualize cyanin-labeled proteins and were analyzed using DeCyder Differential Analysis Software v6.0 (Amersham GE Healthcare).

2.4. Proteins identification

A preparative 2DGE was performed using 300 µg of unlabeled proteins, fixed and stained with Ruthenium II solution synthesized according to (Rabilloud et al., 2001). Spots were excised from gel with automated Ettan Spot Picker (Amersham GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. Nano-LC-QTOF-MSMS was used to analyze peptides obtained by trypsin digestion. Peptides were separated prior MS on a nano C18 column (Atlatis, 75 µM, 150 mm, 3 µm NanoEase column; Waters). The micro-sequence of peptides was obtained by using a Cap-LC coupled to a Q-time-of-flight instrument (Waters). Mass spectra were acquired using the MassLynx 4.0 software (Waters). Data were used to identify protein candidates by sequences similarity against available human protein database using an in-house Mascot search server (version 2.0) (Matrix Sciences) and human protein database.

2.5. 1D Western blot analysis

Cell lysis buffer contained Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM, NaCl 100 mM, glycerol 10% (Merck), NP-40 1%

(Sigma–Aldrich), SDS 0.1% (MP Biomedicals), deoxycholate 0.5% (Merck), DTT 2 mM (Amersham GE Healthcare), proteases inhibitors cocktail 4% (Roche) and phosphatases inhibitors buffer 4% containing Na₃VO₄, NaF 1 M (Merck), *p*-nitrophenylphosphate 1 M and glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate 1 M (Sigma–Aldrich). Western blots were performed as described in Frippiat et al. (2001) using these antibodies: anti-annexin A2 mouse IgG (BD Transduction Laboratories), anti- α -tubulin mouse IgG (Clone B-5-1-2, Sigma–Aldrich). α -Tubulin was the reference protein to normalize the results of total cell lysates.

2.6. Semi-quantitative RT-real time PCR analysis

Total RNA was extracted (RNAagents, Total RNA Isolation System, Promega). Starting from 2 µg total RNA, mRNA was retrotranscribed using oligo-dT_{12–18}, dNTP and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Primers were determined by using the Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems) (Table S1). Real time PCRs were performed as described in (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as transcript of reference.

2.7. Confocal microscopy

HDFs were seeded at 20,000 cells/cm² in MEM + 10% FBS on glass cover slide. At 24 h after seeding, cells were fixed and permeabilized with methanol 80% and acetone 20% (Merck). Specific mouse antibody ANXA2 was added following by the specific Alexa Fluor 488 anti-mouse conjugate antibody (Molecular Probes). To visualize the nucleus, cells were incubated with TO-PRO-3 (ICN).

2.8. Study of ANXA2 abundance by 2DGE and fluorescent-based ECL Plex Western blotting detection

Twenty-five micrograms of proteins from microsomal extracts were labeled with cyanine dyes Cy3. Fifty micrograms of non-labeled proteins from microsomal extracts were added for the samples and diluted with a double volume of sample buffer. Insoluble material was removed by centrifugation (13,000 rpm). Proteins were blotted onto a hybond ECL (low fluorescent polyvinylidene difluoride) membrane which were incubated with the specific mouse annexin A2 primary antibody (dilution 1:250 in PBST-BA), and incubated with secondary antibody, ECL Plex goat- α -mouse IgG-Cy5 (dilution 1:2500 in PBST-BA) before to scanning. The images were analyzed using the ImageQuant TL Control Centre software with the Arrays Analysis module. For normalization, we took optical density of 10 spots which normalized ratio between both conditions obtained in 2D-DIGE analysis was around 1.0 without significant variation. The ratios of optical densities between both conditions were calculated for each spot detected with cyanines.

3. Results

3.1. Analysis of microsomal proteins of IMR-90 HDFs in H_2O_2 -induced premature senescence

The main biomarkers of senescence were found as previously checked (Frippiat et al., 2001): decrease of proliferative potential from day 2 to day 3 after treatment and SA β -gal at 3 days after H_2O_2 treatment. Protein from three independent cultures of H_2O_2 -treated and control HDFs labeled with either Cy3 or Cy5 dyes and internal standard labeled with Cy2 were mixed and resolved on 2DGE. The three gels were run together (Fig. S1A). A total of ± 1500 spots were located on each gel. Only those variations with a minimum ratio of 1.5-fold and p values of Student's test ≤ 0.05 between both conditions were kept, representing 14 more intense and 19 less intense protein spots in H_2O_2 -treated cells compared to control cells (Table 1 and Fig. S1B). On the preparative gel, 23 of these 14 + 19 spots could be cherry-picked for MS analysis, of which 17 were successfully identified (Table S2). This represented 12 different protein species since several spots contained the same protein. The average changes in both conditions for these spots is shown in Fig. S2. Many of the proteins identified are not known to be microsomal (Table 1); however, they can associate with membrane proteins (see [supplementary material online](#)).

Some spots corresponded to a mix of two proteins, like spots 1842, 1866, 1879, 1915 and 1979 corresponding to a mix of annexin A2 (ANXA2) and GAPDH or lactate dehydrogenase A. ANXA2 is a Ca^{2+} -dependent plasma membrane protein regulating the membrane trafficking involved in actin reorganization (Caplan et al., 2004), which is observed in premature senescence (Chen et al., 2000). We studied its mRNA and protein abundance as well as its subcellular localization at 72 h after treatment with H_2O_2 .

3.2. Abundance of ANXA2 mRNA and protein in H_2O_2 -induced premature senescence

We analyzed the abundance of ANXA2 mRNA in H_2O_2 -treated and control cells by RT-real time PCR. There was no difference at 1 and 2 days after treatment. A significant slight increase of 1.2 ± 0.1 -fold was observed at 72 h after treatment with H_2O_2 (Fig. 1A). Although 2D-DIGE analysis showed that the microsomal abundance of ANXA2 was increased in five different spots, the results obtained by Western blotting from total cell lysates showed no difference between treated and control cells (Fig. 1Ba). Analysis of immuno-labeled ANXA2 by confocal microscopy showed an increase of the peripheral localization after treatment with H_2O_2 (Fig. 1C). When microsomal fractions obtained at 72 h after the 2-h treatment with H_2O_2 were analyzed by Western blot, a 1.4 ± 0.1 -fold increase of ANXA2 abundance was observed in H_2O_2 -treated cells (Fig. 1Bb) which confirmed the results obtained by 2D-

DIGE. We analyzed the abundance of ANXA2 in the microsomal fraction with an innovative technical approach combining 2DGE and the fluorescent-based ECL Plex Western blotting detection system (2D-PLEX). A same amount of microsomal protein extracts from the H_2O_2 -treated and control cells was labeled with Cy3 dye and separated by 2DGE prior transfer on a low fluorescent membrane and incubation with specific ANXA2 fluorescent dye-labeled antibody (Fig. 2A). We determined the ratios of the intensities of the fluorescent spots in both control and H_2O_2 -treated conditions. For normalization, we selected 10 spots obtained from the 2D-DIGE which presented an average ratio ± 1.0 , thus proteins with no significant variation between control and H_2O_2 conditions (Fig. S3).

The optical density (O.D.) of ANXA2 spots A1, A11, A17 increased more than 2-fold in H_2O_2 -treated condition compared to the corresponding ANXA2 A2, A12, A18 spots in the control condition (Fig. 2B). The O.D. of ANXA2 spots A3, A5, A15 and A19 showed an increase of at least 1.5-fold compared to the control condition. The ANXA2 spots A7, A9, A13 and A21 had a difference in O.D. lower than 1.5 in H_2O_2 -treated condition compared to their corresponding ANXA2 spots in control condition.

4. Discussion

Most of the proteins identified herein as undergoing change of abundance in H_2O_2 -induced premature senescence can be associated with membranes and are briefly described in the [supplementary material](#) available online. We observed increased abundance of ANXA2 in the microsomal fraction of proteins. Annexins bind to negatively charged phospholipids in cellular membranes in a Ca^{2+} -dependent manner. ANXA2 is unique among the annexins family, by its structural and biochemical features (Caplan et al., 2004; Gerke et al., 2005). ANXA2 exists either as a 36 kDa monomer or can associate with the S100A10 protein, a member of the S100-protein family, in a heterotetramer (Liu et al., 2003). ANXA2 interacts with another S100 protein family: calyculin, a Ca^{2+} -binding protein associated with GAPDH (Filipek and Wojda, 1996). This interaction of calyculin with GAPDH and ANXA2 could explain the mix of these proteins found herein. ANXA2 may be localized in the cytoplasm, nucleus, or membrane domains like the lipid rafts, Golgi apparatus or endoplasmic reticulum. It may affect positively DNA synthesis and cell proliferation, participate in ion channel regulation, or formation of tight junctions and is involved in the regulation of membrane trafficking events such as the exocytosis and endocytosis (Caplan et al., 2004; Yee et al., 2007; Yoo and Hayman, 2007).

Multiple alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms exists for the gene of ANXA2 (Upton and Moss, 1994). The transcript variant 1 encodes the longer isoform, transcript variant 2 lacks a segment but

Table 1

Successful identifications of the spots with altered abundance between IMR-90 HDFs in H₂O₂-induced premature senescence or not

A

	Spot #	Identification	Ratio	t-Test	Main know function	Localization
1	1842	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	3.4	0.04	Carbohydrate degradation; glycolytic enzyme + calcium-regulated membrane-binding protein	Cytoplasm and nuclear + extracellular matrix; basement membrane
2	1866	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	3.3	0.03	Carbohydrate degradation; glycolytic enzyme + calcium-regulated membrane-binding protein	Cytoplasm and nuclear + extracellular matrix; basement membrane
3	2065	Cathepsin D	1.8	0.05	Aspartic peptidase	Lysosome; cytoplasm
4	1879	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	1.8	0.04	Carbohydrate degradation; glycolytic enzyme + calcium-regulated membrane-binding protein	Cytoplasm and nuclear + extracellular matrix; basement membrane
5	815	Vimentin	1.8	0.05	Cytoskeletal	Cytoplasm
6	1915	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	1.7	0.04	Carbohydrate degradation; glycolytic enzyme + calcium-regulated membrane-binding protein	Cytoplasm and nuclear + extracellular matrix; basement membrane
7	1304	26S proteasome alpha 5 subunit	−1.5	0.001	Protein degradation	Cytoplasm
8	1286	Vimentin + β-tubulin	−1.6	0.03	Cytoskeletal + cytoskeletal	Cytoplasm + cytoplasm
9	2126	Proteasome alpha 4 subunit	−1.6	0.01	Protein degradation	Cytoplasm
10	1639	26S proteasome subunit p45	−1.6	0.02	Protein degradation	Cytoplasm
11	1979	Lactate dehydrogenase A + annexin A2	−1.6	0.04	Glycolysis + calcium-regulated membrane-binding protein	Cytoplasm + extracellular matrix; basement membrane
12	2260	Proteasome beta 2 subunit	−1.6	0.04	Protein degradation	Cytoplasm
13	1120	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	−1.7	0.01	Nuclear metabolism of hnRNAs	Cytoplasm; nucleus; mitochondria
14	1630	26S proteasome subunit p45	−1.8	0.04	Protein degradation	Cytoplasm
15	1295	β-Tubulin + vimentin	−1.8	0.02	Cytoskeletal + cytoskeletal	Cytoplasm + cytoplasm
16	2104	Proteasome activator complex	−1.9	0.05	Immunoproteasome assembly	Cytoplasm
17	1292	Vimentin + β-tubulin	−2.1	0.02	Cytoskeletal + cytoskeletal	Cytoplasm + cytoplasm

B

	Spot #	Identification	Score	Matching peptides	Sc (%)	pI	Molecular weight	Accession No.
1	1842	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	133	4	11	7.8	38551	P04406
			125	2	6	8.9	36030	P07355
2	1866	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	353	6	17	8.7	36030	P04406
			155	4	11			P07355
3	2065	Cathepsin D	147	3	12	5.1	26229	P07339
4	1879	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	134	5	14	7.8	38551	P04406
			105	2	6	8.9	36030	P07355
5	815	Vimentin	89	2	5	5.1	77359	NP_003371
6	1915	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase + annexin A2	134	7	14	8.9	36030	P04406
			105	2	6	7.8	38551	P07355
7	1304	26S proteasome alpha 5 subunit	99	2	5	4.7	40605	P55036
8	1286	Vimentin + β-tubulin	481	14	37	4.9	53547	NP_003371
			398	8	19			NP_821133
9	2126	Proteasome alpha 4 subunit	84	2	6	7.7	29750	NP_002780
10	1639	26S proteasome subunit p45	198	6	15	7.4	31184	P62195
11	1979	Lactate dehydrogenase A + annexin A2	219	4	12	8.5	36557	P00338
			159	3	6			P07355
12	2260	Proteasome beta 2 subunit	84	2	8	9.5	27797	NP_002785
13	1120	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	360	6	12	5.3	47527	P61978
14	1630	26S proteasome subunit p45	118	2	5	8.4	45624	P62195
15	1295	β-tubulin + vimentin	354	5	11	4.9	53547	NP_821133
			337	10	19			NP_003371
16	2104	Proteasome activator complex	72	2	10	5.4	29785	Q06323
17	1292	Vimentin + β-tubulin	312	13	27	4.9	53547	NP_003371
			192	5	11			NP_821133

A: spot number (spot #), name of protein, average ratio between the two conditions, *p* values, main known function and known subcellular localization are given.
 B: score obtained in Mascot database, number of matching peptides, accession number, theoretical isoelectric point (pI) and theoretical molecular weight, are given.

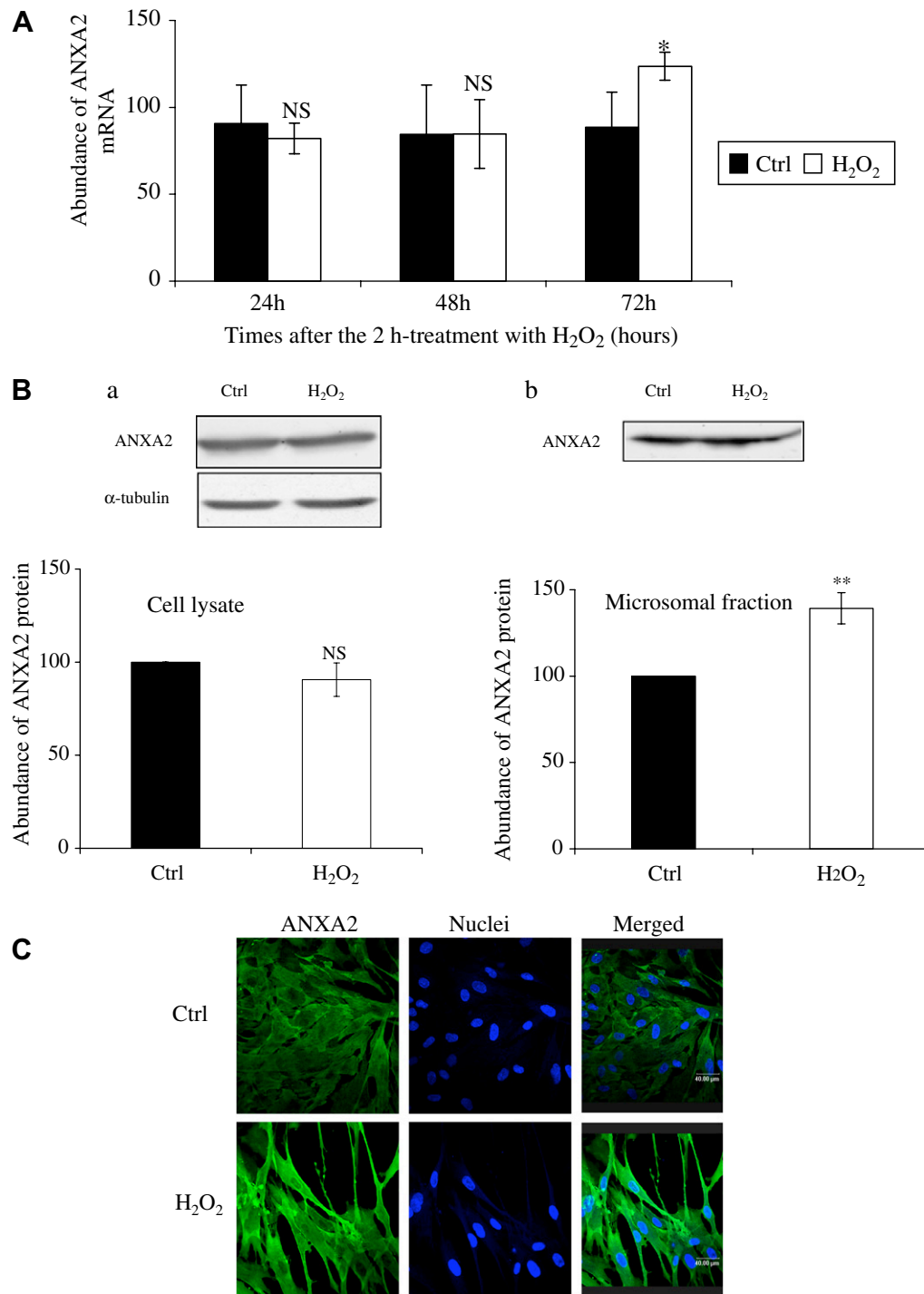


Fig. 1. Abundance of ANXA2 mRNA and protein, subcellular localization of ANXA2 in H₂O₂-induced premature senescence. (A) Abundance of ANXA2 mRNA in IMR 90-HDFs at increasing times after treatment with H₂O₂. Total RNA was extracted at 0, 24, 48 and 72 h after treatment from control and treated cells. GAPDH mRNA abundance was used as reference in the RT-real time PCR analysis. Analyses were performed in three independent experiments. Results are expressed as 100% of the mRNA abundance in control cells just before exposure to H₂O₂ (0 h). Statistical analysis was carried out with the Student's *t*-test. NS, non-significant ($p > 0.05$); * $0.05 > p > 0.01$. (B) Abundance of ANXA2 protein. Total proteins or microsomal proteins were extracted at 72 h after the treatment with H₂O₂. α -Tubulin was used as reference for the Western blot on total cell lysates. Analyses were performed in three independent experiments. Results are expressed as 100% of the protein abundance in control cells. Statistical analysis was carried out with the Student's *t*-test. NS, non-significant ($p > 0.05$); ** $p < 0.01$. (C) Subcellular localization of ANXA2. IMR 90-HDFs were treated for 2 h with 150 μ M H₂O₂ and were seeding on glass cover slides at 48 h after the treatment. Cells were fixed 24 h later and the ANXA2 subcellular localization was detected using a specific antibody (green). The nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

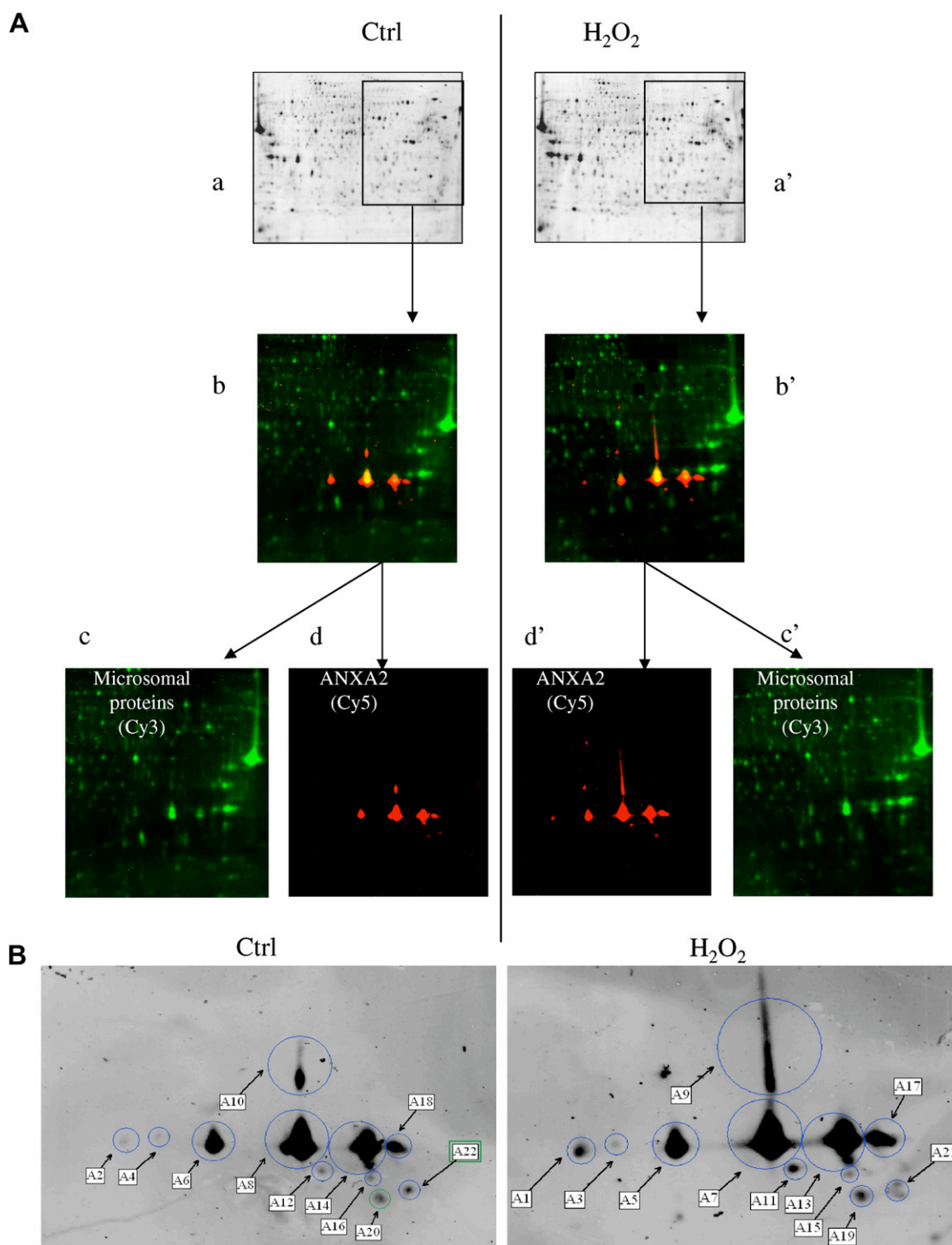


Fig. 2. Abundance of ANXA2 at 72 h after treatment of IMR-90 HDFs for 2 h with 150 μM H_2O_2 by coupling 2DGE and the fluorescent-based ECL Plex Western blotting detection system. Total proteins were extracted at 72 h after the treatment from control and treated cells. Microsomal proteins were obtained by differential centrifugation and labeled with Cy3 dye for both conditions. (A) Microsomal proteins were separated by 2DGE as indicated in Section 2. Proteins were transferred onto a hybond ECL membrane before scanning at the same photomultiplier (PMT) values (a–a') at excitation/emission wavelengths of 488/520 nm (Cy3). Membranes were incubated with annexin A2 antibodies and a secondary antibody coupled with Cy5 before scanning at the same PMT values at excitation/emission wavelengths of 488/520 nm for Cy3 and 532/580 nm for Cy5 for the microsomal proteins (c–c') and annexin A2 (d–d'), respectively (b–b': superimposed image). (B) Each spot detected with the specific annexin A2 antibody was quantified using the ImageQuant TL Control Centre software with the Arrays Analysis module.

has an additional exon in the 5' region, as compared to variant 1. It uses a downstream AUG start codon and encodes isoform 2 which has a shorter N-terminus, as compared to

isoform 1. The transcript variant 3 and 2 encodes the same isoform. Moreover, there are several types of post-translational modifications of ANXA2 like glutathiolation,

phosphorylation, proteolysis, ubiquitination or acetylation (Babiychuk et al., 2002; Erikson and Erikson, 1980; Lauvrak et al., 2005; Singh and Liu, 2000; Sullivan et al., 2000). Protein oxidation is observed in H₂O₂-induced premature senescence of IMR-90 HDFs (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Petropoulos and Friguet, 2006). Oxidation of ANXA2 by diamide results in a time- and concentration-dependent loss of the ability of ANXA2 to interact with phospholipids liposomes and F-actin (Caplan et al., 2004). These multiple possibilities of transcriptional splice variants and modifications may explain the different spots observed herein. Therefore, we analyzed transcript and protein abundance of ANXA2 by using primers and antibodies allowing the detection of all the isoforms.

Since the concentration of cytosolic calcium (Ca²⁺) increases in conditions of oxidative stress (Degl'Innocenti et al., 1999), this could result in an increase of the ANXA2 abundance in plasma membrane. Moreover, ANXA2 can organize membrane domains and membrane recruitment platforms for proteins by interaction with these proteins (Gerke et al., 2005). Annexins have the requisite properties to integrate Ca²⁺-signaling with actin dynamics at membrane contact sites (Hayes et al., 2004). Thus, ANXA2 represents a possible effector of H₂O₂-induced premature senescence morphogenesis and further study should clarify its role in SIPS and/or aging.

Acknowledgements

Aline Chrétien is a recipient of a FRIA fellowship, Belgium. O. Toussaint is Research Associate of the FNRS, Belgium. We thank Dr. Béatrice Rayet for critically reading the manuscript. We acknowledge the Région Wallonne, First-DEI project 'Cosmet-X', and the 'Réseaux II Senegene' and 'Nanotoxico' projects. We also thank the EC for the Integrated projects and Proteomage (LSHM-CT-2005-518230); Coordination Action Link-Age (LSHM-CT-2005-513866); and "Matiss" Marie Curie Project (MTKI-CT-2006-042768).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.exger.2008.01.003](https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.01.003).

References

- Babiychuk, E.B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F.C., Wray, S., Draeger, A., 2002. Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *FASEB J.* 16, 1177–1184.
- Bae, S.H., Harris, A.G., Hains, P.G., Chen, H., Garfin, D.E., Hazell, S.L., Paik, Y.K., Walsh, B.J., Cordwell, S.J., 2003. Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* 3, 569–579.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewicz, H., Toussaint, O., 2000. EMBO Workshop Report: molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18–22, 1999. *EMBO J.* 19, 1929–1934.
- Caplan, J.F., Filipenko, N.R., Fitzpatrick, S.L., Waisman, D.M., 2004. Regulation of annexin A2 by reversible glutathionylation. *J. Biol. Chem.* 279, 7740–7750.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., Dilley, T., 2000. Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 22), 4087–4097.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., et al., 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J. Cell Sci.* 118, 743–758.
- Degl'Innocenti, D., Pieri, A., Rosati, F., Ramponi, G., 1999. Oxidative stress and calcium homeostasis in dystrophic skin fibroblasts. *IUBMB Life* 48, 391–396.
- Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M., Toussaint, O., 2002a. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1011–1017.
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P., Toussaint, O., 2002b. Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.* 531, 499–504.
- Erikson, E., Erikson, R.L., 1980. Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell* 21, 829–836.
- Filipek, A., Wojda, U., 1996. p30, a novel protein target of mouse calcyclin (S100A6). *Biochem. J.* 320 (Pt 2), 585–587.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J., Toussaint, O., 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 2531–2537.
- Gerke, V., Creutz, C.E., Moss, S.E., 2005. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 449–461.
- Hayes, M.J., Rescher, U., Gerke, V., Moss, S.E., 2004. Annexin-actin interactions. *Traffic* 5, 571–576.
- Lauvrak, S.U., Hollas, H., Doskeland, A.P., Aukrust, I., Flatmark, T., Vedeler, A., 2005. Ubiquitinated annexin A2 is enriched in the cytoskeleton fraction. *FEBS Lett.* 579, 203–206.
- Liu, J., Rothermund, C.A., Ayala-Sanmartin, J., Vishwanatha, J.K., 2003. Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II. *BMC Biochem.* 4, 10.
- Petropoulos, I., Friguet, B., 2006. Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair. *Free Radic. Res.* 40, 1269–1276.
- Rabilloud, T., 2003. Membrane proteins ride shotgun. *Nat. Biotechnol.* 21, 508–510.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A., Lunardi, J., 2001. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1, 699–704.
- Singh, T.K., Liu, L., 2000. Modification of cysteine residues by N-ethylmaleimide inhibits annexin II tetramer mediated liposome aggregation. *Arch. Biochem. Biophys.* 381, 235–240.
- Sullivan, D.M., Wehr, N.B., Fergusson, M.M., Levine, R.L., Finkel, T., 2000. Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF-alpha induces protein glutathiolation. *Biochemistry* 39, 11121–11128.
- Upton, A.L., Moss, S.E., 1994. Molecular cloning of a novel N-terminal variant of annexin II from rat basophilic leukaemia cells. *Biochem. J.* 302 (Pt. 2), 425–428.
- Yee, D.S., Narula, N., Ramzy, I., Boker, J., Ahlering, T.E., Skarecky, D.W., Ornstein, D.K., 2007. Reduced annexin II protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131, 902–908.
- Yoo, J.C., Hayman, M.J., 2007. Annexin II binds to SHP2 and this interaction is regulated by HSP70 levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 906–911.

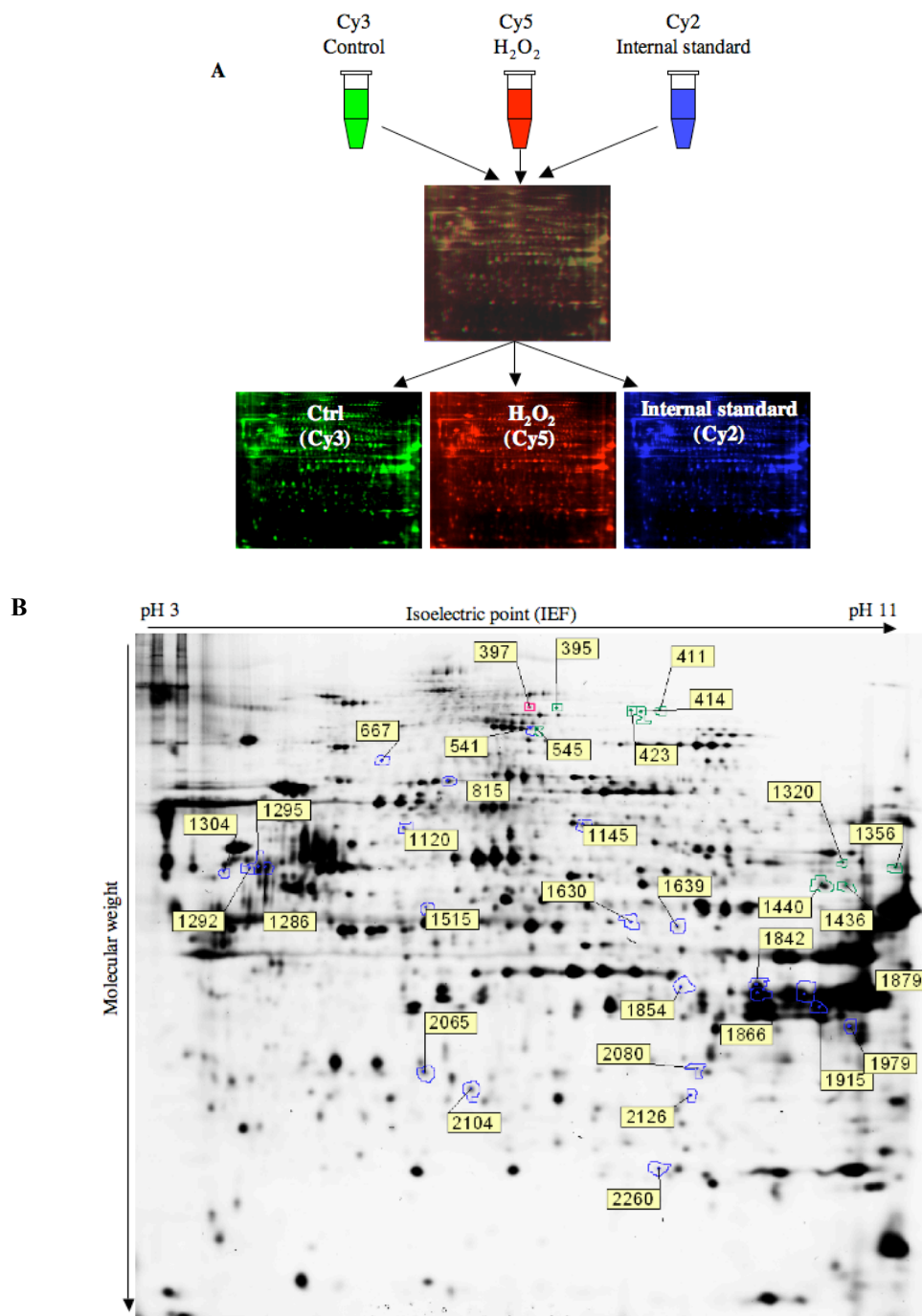


Figure S1: Typical 2D gels obtained in this study

A: At 24 h after seeding, IMR-90 HDFs were treated for 2 h with H_2O_2 at 150 μM . Proteins were extracted at 72 h after the 2 h-treatment with H_2O_2 and microsomal proteins were obtained by differential centrifugation. Three independent experiments were performed to obtain 3 control samples and 3 samples from H_2O_2 -treated cells. Proteins extracted from IMR-90 HDFs in H_2O_2 -induced premature senescence or not were labeled with respectively Cy3 or Cy5 dye. In addition, an internal standard consisting of aliquots of all samples included in the experimental series was labeled with Cy2. Equal amount of Cy3-, Cy5- and Cy2-labeled protein extracts were mixed and separated by denaturing 2D on the same gel electrophoresis. Three different gels were run using a pH range of 3-11 in the first dimension and SDS-PAGE (10%) in the second dimension. Dye-specific images of the gels were recorded with fluorescence scanner.

B: Analytical 2D gel of Cy5 labeled proteins from IMR-90 HDFs in H_2O_2 -induced premature senescence. After scanning, determination of protein spot abundance and statistics were carried out automatically using the DeCyder 2D Differential Analysis software version 6.0. Arrows and numbers on 2D image of H_2O_2 -treated fibroblasts indicate the 33 spots corresponding to proteins which abundance is altered in premature senescence.

La table S2 du matériel supplémentaire concernant les données obtenues en spectrométrie de masse est présentée en annexe 2 à la page 244 du manuscrit.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Introduction

While numerous studies reported alterations of signal transduction or gene expression in SIPS of HDFs (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Fripiat et al., 2002; Zdanov et al., 2006), no studies tried to examine the differential expression of more specific groups of proteins like microsomal proteins and especially plasma membrane proteins. 2DGE is still a method of choice for separating complex mixtures of proteins for visual comparison in proteome analysis (Gorg et al., 2000; Klose and Kobalz, 1995; O'Farrell, 1975; Rabilloud, 2002). However, this technology is biased against certain classes of proteins including low abundance and hydrophobic proteins. Proteins with extremely alkaline isoelectric point are often very poorly represented using 2DGE technology. Highly hydrophobic membrane proteins are nearly impossible to solubilize in current electrophoretic protocols (Bae et al., 2003). Many studies were undertaken to improve their solubilization and showed that using compounds like chaotropes (urea and thiourea) or the right choice of detergent is very important. Indeed, zwitterionic detergents, like aminosulfobetaines, improve the analysis of membrane proteins by 2DGE (Chevallet et al., 1998; Chinnasamy and Rampitsch, 2006; Luche et al., 2003; Rabilloud, 1998; Rabilloud et al., 2007; Santoni et al., 2000; Vuillard et al., 1995). In this study, proteins from microsomal fraction of IMR-90 HDFs in H₂O₂-induced premature senescence were solubilized with high concentration of ASB-14. After extraction, the proteins were diluted in urea, thiourea and Triton-X100 buffer before isoelectric focusing. The proteins were labeled with fluorescent dyes to take advantage of highly sensitive detection of the 2D-DIGE technique.

Strategy of proteomic analysis and accuracy of MS/MS identifications

Samples of 25 µg protein from 3 independent cultures of H₂O₂-treated and control HDFs were labeled with either Cy3 or Cy5 dyes and internal standard labeled with Cy2 were mixed and resolved on 24 cm pH 3-11 IEF strips followed by isolation by 10 % SDS-PAGE in the second dimension. The 3 gels were run together. Images were obtained with a scanner at three different excitation wavelengths appropriate for the dyes (figure S1A). Statistical analysis revealed 33 spots with a significant 2-fold difference of integrated intensity (figure S1B). We identified the proteins corresponding to 17 spots pinpointed in this analytical step. When MS/MS analysis was performed, the score and expect value obtained in Mascot database and peptides used for identification were listed in the following table S2. All the identifications were obtained with 2 peptides or more. This represented 12 different protein species since several spots contained the same protein.

Names	Sequences	Positions (bp)	GenBank
ANXA2			NM_001002858 (1) NM_001002857 (2) NM_004039 (3)
forward	5'- TGGATGAGGTCACCATTGTCA -3'	1740-1761	
reverse	5'- GCGAAGGCAATATCCTGTCTC -3'	1801-1822	
GAPDH			NM_002046
forward	5'- ACCCACTCCTCCACCTTTGAC -3'	942-963	
reverse	5'- GTCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'	1033-1053	

Table S1: Sequences and positions of the primers used in RT real-time PCR analysis. Numbers in parenthesis correspond to transcripts variants of ANXA2.

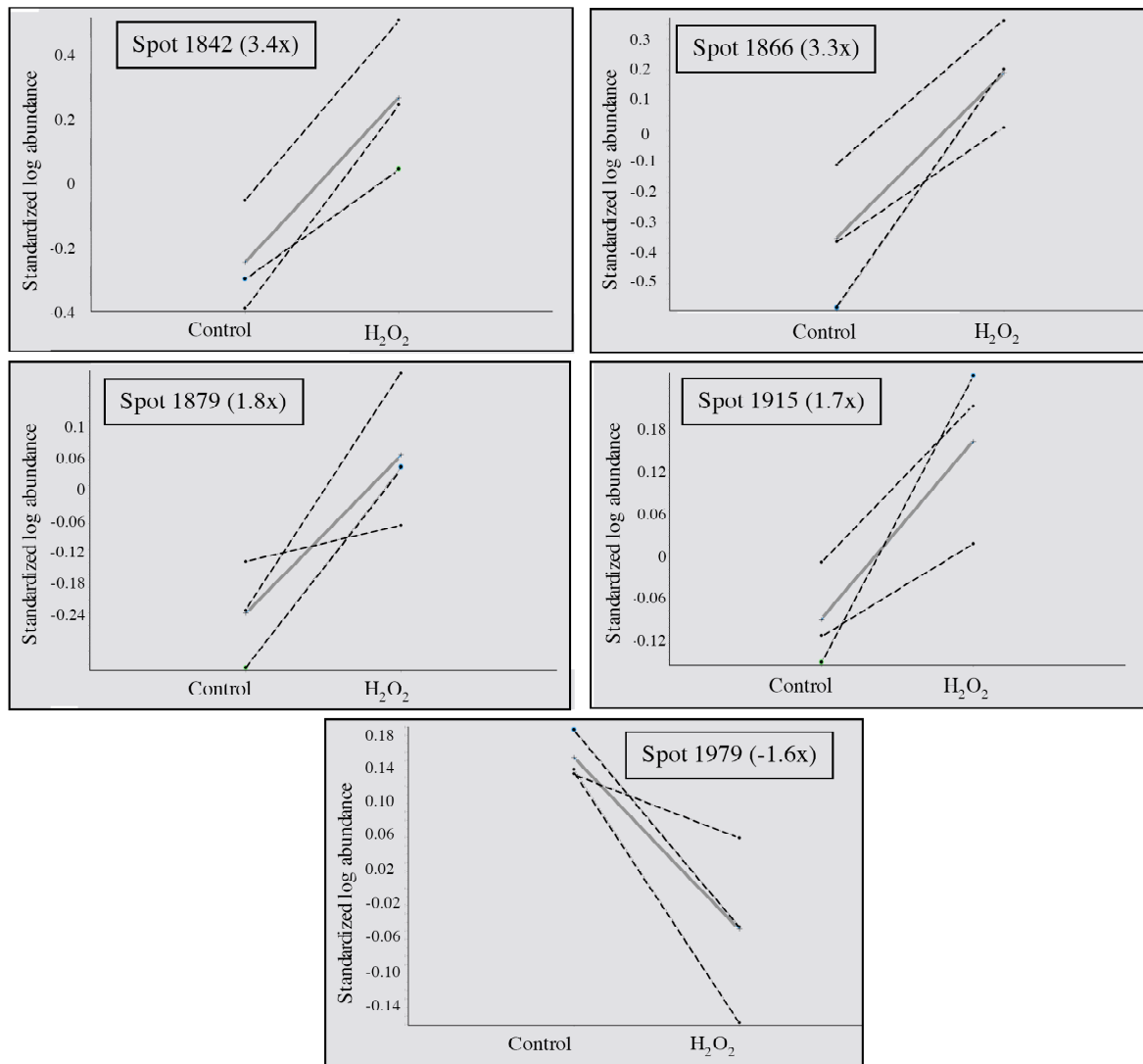


Figure S2: Standardized log abundance of 5 spots (#1842, 1866, 1879, 1915, 1979) corresponding to ANXA2 in the 3 control and H₂O₂-treated population of IMR-90 HDFs. Mean variation is shown in bold line. This represents amplitude of variation (fold change between brackets). Only spot 1979 shows decreased intensity.

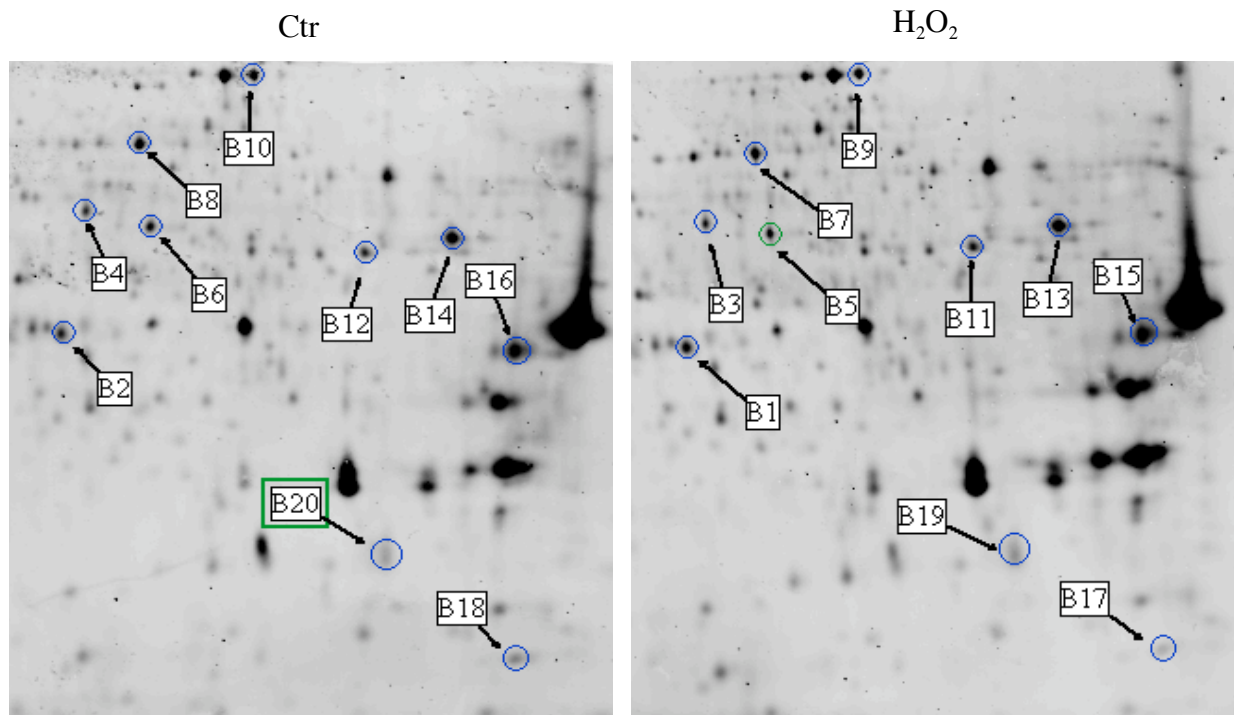


Figure S3: Reference spots were selected in list of spots detected by 2D-DIGE which ratio between control and H₂O₂-treated conditions was close to 1.0, so without significant variation. They were reported on the 2D-PLEX membrane images after matching and quantified to make sure that the optical densities were equal between the two experimental conditions.

Annexin A2: average changes of corresponding spots

In addition, some spots corresponded to a mix of two proteins. For example, spots 1842, 1866, 1879, 1915 and 1979 corresponded to a mix of annexin A2 (ANXA2) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) or lactate dehydrogenase A. The average changes in both conditions for spots 1842, 1866, 1879, 1915 and 1979 is shown in figure S2.

Annexin A2: choice of primers for RT-PCR

Because results from proteome analysis suggested that ANXA2 presents an increase in spot intensity in cells treated with H₂O₂, a possible explanation of this phenomenon is the increase of corresponding mRNA abundance. Sequences and positions of the primers were determined to allow amplification of cDNA retro-transcribed from the 3 transcripts splice variants of ANXA2 (Primer Express 1.5 software, Applied Biosystems, Foster City, USA). Primers were listed in table S1 and ANXA2 mRNA abundance was analyzed by RT-real time PCR.

Supplementary discussion

Herein, we briefly describe the proteins other than ANXA2 which were identified as undergoing change in H₂O₂-induced premature senescence and that can be associated with membranes.

Vimentin (1.8-, -1.6-, -1.8-, -2.1-fold change) is a constituent of the intermediate filaments of mesenchymal tissue, along with the microfilaments (actin) and microtubules (tubulin). Vimentin can bind membrane vesicles in erythrocytes, using the exposed head domains of the intermediate filaments terminal subunits. The major vimentin acceptor site on the membrane is the ankyrin (Georgatos and Marchesi, 1985; Georgatos et al., 1985). It has been described that membranes specialized in different cell functions, i.e., plasma membranes and mitochondrial membranes possess high-affinity, large-capacity tubulin-binding site in the brain (Bernier-Valentin et al., 1983). Authors propose that tubulin-membrane interaction involves the assembly of a limited number of tubulin dimers in a “micropolymerisation” process initiated by a membrane component present in various cellular membranes or by different membrane components exhibiting a common property (Bernier-Valentin et al., 1983). Senescence-associated alterations of cytoskeleton like dramatic production of vimentin have been shown in senescent HDFs (Nishio and Inoue, 2005). Accumulation of modified vimentin is found in skin HDFs of elderly donors, which is linked with loss of skin contractile functions (Kueper et al., 2007). In contrast, senescent skin HDFs have down-regulated actin and β -tubulin (Nishio and Inoue, 2005). β -tubulin was identified in this study as mixed with vimentin in our study and presented a decrease of abundance (-1.6-, -1.8-, -2.1-fold change). Since increase of vimentin abundance was identified in spot 815, we can propose that the abundance of β -tubulin is decreased in H₂O₂-induced premature senescence.

We also identified different subunits of regulation of the proteasome (α 4 subunit, α 5 subunit, β 2 subunit, p45 subunit, activator complex). The 26S protease is involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins.

The proteasome is a multicatalytic proteinase complex with a highly ordered ring-shaped 20S core structure. The core structure is composed of 4 rings of 28 non-identical subunits; 2 rings are composed of 7 alpha subunits and 2 rings are composed of 7 beta subunits. The regulatory 19S (or ATPase) complex confers ATP dependency and substrate specificity to the 26S complex. The 19S complex is composed of at least 18 different subunits in two subcomplexes, the base and the lid, which form the portions proximal and distal to the 20S proteolytic core, respectively. The 26S proteasome non-ATPase regulatory (11S) binds and presumably selects ubiquitin-conjugates for destruction. An essential function of a modified proteasome, the immunoproteasome, is the processing of class I MHC peptides. Proteasome activator complex is implicated in immunoproteasome assembly and is required for efficient antigen processing (Squier, 2001). All the subunits of the 26S proteasome were found to interact with FK506-binding protein, a member of the immunophilin family that resides in the mitochondrial outer membrane and the endoplasmic reticulum membrane (Nakagawa et al., 2007).

Subunits $\alpha 4$, $\alpha 5$ and $\beta 2$ are constituents of the core 20S and the p45 subunit represent a component of the 19S regulatory complex. All these subunits were down-regulated in H_2O_2 -induced premature senescence (-1.6-, -1.5-, -1.6-, -1.6-, -1.8-, -1.9-fold change respectively).

IMR-90 HDFs in H_2O_2 -induced premature senescence contain more oxidative proteins. However, the activity of proteasome does not seem to change (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Other degradation systems existing in cells could be involved in degradation of these oxidative proteins in our model.

In agreement with this hypothesis, we identified cathepsin D (1.8-fold change), an acid protease involved in intracellular protein breakdown and involved in the pathogenesis of several diseases such as breast cancer and possibly Alzheimer disease (Ntais et al., 2004). Coated vesicles isolated from HDFs contain the precursor of cathepsin D (Schulze-Lohoff et al., 1985). These authors demonstrated that cathepsin D is only transiently associated with coated membranes. These observations supported the view that coated membranes participate in the transfer of precursor forms of endogenous lysosomal enzymes to lysosomes (Schulze-Lohoff et al., 1985). In macrophages cells, it was demonstrated that cathepsin D is transported to endosomes as a membrane-associated form and that this membrane-associated form is a precursor for the soluble form found in endosomes and lysosomes (Diment et al., 1988).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a glycolytic enzyme (Mazzola and Sirover, 2005).

Lactate dehydrogenase A is involved in the final step of anaerobic glycolysis (Onishi et al., 2005).

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) (-1.7-fold change) is one of the major pre-mRNA-binding proteins. This protein plays a role in the nuclear metabolism of hnRNAs,

particularly for pre-mRNAs that contain cytidine-rich sequences. In NIH3T3 murine fibroblasts, platelet-derived-growth-factor regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of ubiquitin E3-ligase (Nagano et al., 2006). A large-scale proteomic study identified new K protein partners, some typically found in subcellular compartments, such as plasma membrane, where K protein had not previously been seen. Indeed, hnRNP-K interacts with the adaptater protein Grb2 (Mikula et al., 2006). This interaction adds further evidence for the role of K protein in coupling signal transduction pathways to RNA-directed processes, including cascades initiated by receptor tyrosine kinases. This protein had never been described as involved in SIPS.

Supplementary references

Bae, S. H., Harris, A. G., Hains, P. G., Chen, H., Garfin, D. E., Hazell, S. L., Paik, Y. K., Walsh, B. J. and Cordwell, S. J. (2003). Strategies for the enrichment and identification of basic proteins in proteome projects. *Proteomics* **3**, 569-79.

Bernier-Valentin, F., Aunis, D. and Rousset, B. (1983). Evidence for tubulin-binding sites on cellular membranes: plasma membranes, mitochondrial membranes, and secretory granule membranes. *J Cell Biol* **97**, 209-16.

Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquie, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J. and Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 1901-9.

Chinnasamy, G. and Rampitsch, C. (2006). Efficient solubilization buffers for two-dimensional gel electrophoresis of acidic and basic proteins extracted from wheat seeds. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 641-4.

Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S. et al. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* **118**, 743-58.

Diment, S., Leech, M. S. and Stahl, P. D. (1988). Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* **263**, 6901-7.

Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002). Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **33**, 1334-46.

Georgatos, S. D. and Marchesi, V. T. (1985). The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model system for the study of intermediate filament-membrane interactions. *J Cell Biol* **100**, 1955-61.

Georgatos, S. D., Weaver, D. C. and Marchesi, V. T. (1985). Site specificity in vimentin-membrane interactions: intermediate filament subunits associate with the plasma membrane via their head domains. *J Cell Biol* **100**, 1962-7.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-53.

Klose, J. and Kobalz, U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**, 1034-59.

Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G. M., Gaemlich, A., Jung, T. et al. (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem* **282**, 23427-36.

Luche, S., Santoni, V. and Rabilloud, T. (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3**, 249-53.

Mazzola, J. L. and Sirover, M. A. (2005). Aging of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is dependent on its subcellular localization. *Biochim Biophys Acta* **1722**, 168-74.

Mikula, M., Dzwonek, A., Karczmarski, J., Rubel, T., Dadlez, M., Wyrwicz, L. S., Bomszyk, K. and Ostrowski, J. (2006). Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics* **6**, 2395-406.

Nagano, K., Bornhauser, B. C., Warnasuriya, G., Entwistle, A., Cramer, R., Lindholm, D. and Naaby-Hansen, S. (2006). PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP-K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *Embo J* **25**, 1871-82.

Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T. and Nakayama, K. I. (2007). Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells* **12**, 709-19.

Nishio, K. and Inoue, A. (2005). Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* **123**, 263-73.

Ntais, C., Polycarpou, A. and Ioannidis, J. P. (2004). Meta-analysis of the association of the cathepsin D Ala224Val gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease: a HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol* **159**, 527-36.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007-21.

Onishi, Y., Hirasaka, K., Ishihara, I., Oarada, M., Goto, J., Ogawa, T., Suzue, N., Nakano, S., Furochi, H., Ishidoh, K. et al. (2005). Identification of mono-ubiquitinated LDH-A in skeletal muscle cells exposed to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 799-806.

Rabilloud, T. (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 758-60.

Rabilloud, T. (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.

Rabilloud, T., Luche, S., Santoni, V. and Chevallet, M. (2007). Detergents and chaotropes for protein solubilization before two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol* **355**, 111-9.

Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T. (2000). Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21**, 3329-44.

Schulze-Lohoff, E., Hasilik, A. and von Figura, K. (1985). Cathepsin D precursors in clathrin-coated organelles from human fibroblasts. *J Cell Biol* **101**, 824-9.

Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Gerontol* **36**, 1539-50.

Vuillard, L., Marret, N. and Rabilloud, T. (1995). Enhancing protein solubilization with nondetergent sulfobetaines. *Electrophoresis* **16**, 295-7.

Zdanov, S., Debacq-Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2006). Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H₂O₂-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett* **580**, 6455-63.

CONCLUSION

Le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 à une concentration sublétales permet d'induire une sénescence prématurée de ces cellules (Chen and Ames, 1994; Dimri et al., 1995; Frippiat et al., 2001). Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont mis en évidence que le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 à une concentration sublétales induit la phosphorylation de la protéine $p38^{MAPK}$ et l'augmentation de l'abondance de l'ARNm et de la cytokine TGF- β 1. Il a également été montré que le TGF- β 1 participe à l'apparition de la morphologie étalée de type sénescence, la SA- β gal et l'augmentation de l'abondance des transcrits de la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J et SM22 (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Frippiat et al., 2001). Une étude montre que la morphologie plus étalée développée 2 à 3 jours après que des FDHs IMR-90 aient été traités avec H_2O_2 à une concentration sublétales nécessite la présence de la protéine Rb. Une augmentation de fibres de stress d'actine, une redistribution de protéines d'adhérence focale (paxilline et vinculine) sont observées. Une synthèse de protéines *de novo* est nécessaire à l'apparition d'une morphologie sénescence après traitement avec H_2O_2 (Chen et al., 2000c).

Dans ce modèle de sénescence prématurée, l'utilisation d'anticorps neutralisant le TGF- β 1 ne permet pas d'atténuer le blocage du cycle cellulaire et ne protège pas entièrement contre l'apparition de la SA β -gal et de l'augmentation de l'abondance de transcrits de gènes liés à la sénescence. Le TGF- β 1 n'est donc pas le seul responsable de l'induction de la sénescence prématurée des FDHs IMR-90 (Frippiat et al., 2002). Afin d'identifier d'autres protéines impliquées dans l'établissement du phénotype de sénescence prématurée induite par H_2O_2 , nous avons réalisé une étude sur la néosynthèse protéique en utilisant des anticorps neutralisant le TGF- β 1. Les résultats obtenus permettent de conclure que cette cytokine n'est pas la seule protéine responsable de l'induction ou la répression de l'expression protéique entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . En effet, des protéines présentaient des variations d'abondance entre les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 et les FDHs IMR-90 contrôles sans pour autant varier après une stimulation de ces cellules avec du TGF- β 1.

Parmi les protéines d'intérêt présentant une modification d'abondance indépendante du TGF- β 1, nous avons choisi d'étudier des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine. En effet, en ce qui concerne la morphologie étalée des cellules en sénescence prématurée, peu de mécanismes sont actuellement connus. Nous avons donc étudié la néosynthèse de l'eitrine, HSP27 et la caldesmone entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Puisque nous n'avons pu étudier la GAP-Cdc42, une autre protéine identifiée à partir des 2DGE, nous nous sommes penchés sur Cdc42 et Rac1, deux

protéines régulées négativement par la GAP-Cdc42 et sur leur implication dans l'établissement de la morphologie des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée. Pour des raisons de simplicité, nous nous focaliserons uniquement sur ces protéines d'intérêt dans les paragraphes suivants de la discussion. Les autres protéines identifiées durant l'étude protéomique sont brièvement décrites dans le matériel supplémentaire de l'article (Chrétien et al., 2008b).

I. Rôle potentiel de l'eitrine, HSP27, la caldesmone, p38^{MAPK}, Cdc42 et Rac1 dans la sénescence prématurée induite par H₂O₂

I.1. L'eitrine

L'eitrine est néosynthétisée par les FDHs IMR-90 entre le deuxième et le troisième jour après le traitement avec H₂O₂. Nous proposons une hypothèse selon laquelle une relocalisation de l'eitrine serait nécessaire à ce moment, participant ainsi à l'établissement de la morphologie étalée de ces cellules. On sait de la littérature que, chez des cellules épithéliales, la dégradation et la néosynthèse de l'eitrine sont synchronisées dans les temps courts qui suivent un traitement de 30 min avec H₂O₂ (400 μ M). Cette synchronisation permet les changements de morphologie cellulaire observés après ce stress oxydatif (Grune et al., 2002). Ceci signifierait donc peut-être que le changement de conformation de l'eitrine entre les deux formes pourrait être défectueux suite au traitement avec H₂O₂, par exemple suite à son oxydation, et nécessiterait un autre mécanisme de régulation.

Les données de la littérature montrent que la phosphorylation de l'eitrine induit également son activation en permettant sa conformation « ouverte ». Il a été montré par d'autres chercheurs que la restauration de l'expression de Rb dans des cellules d'ostéosarcome induit l'augmentation de la forme totale et phosphorylée de l'eitrine sur la tyrosine 235, ce qui permet l'apparition d'un phénotype ressemblant à de la sénescence, appelé « stase » chez ces cellules cancéreuses. En conséquence de cette phosphorylation, l'eitrine s'associe à la membrane plasmique, ce qui lui permet de participer à l'activation des signaux qui conduisent à la réorganisation du cytosquelette d'actine (Yang and Hinds, 2003). Ainsi, dans notre modèle, une phosphorylation des molécules d'eitrine nouvellement néosynthétisées pourrait être assurée après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂.

Nakamura et son équipe ont montré que la phosphorylation de l'eitrine par N-WASP (« Wiskott-Aldrich syndrome protein ») et MRCK (« Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase ») est très importante chez les fibroblastes murins transformés NIH3T3 exprimant

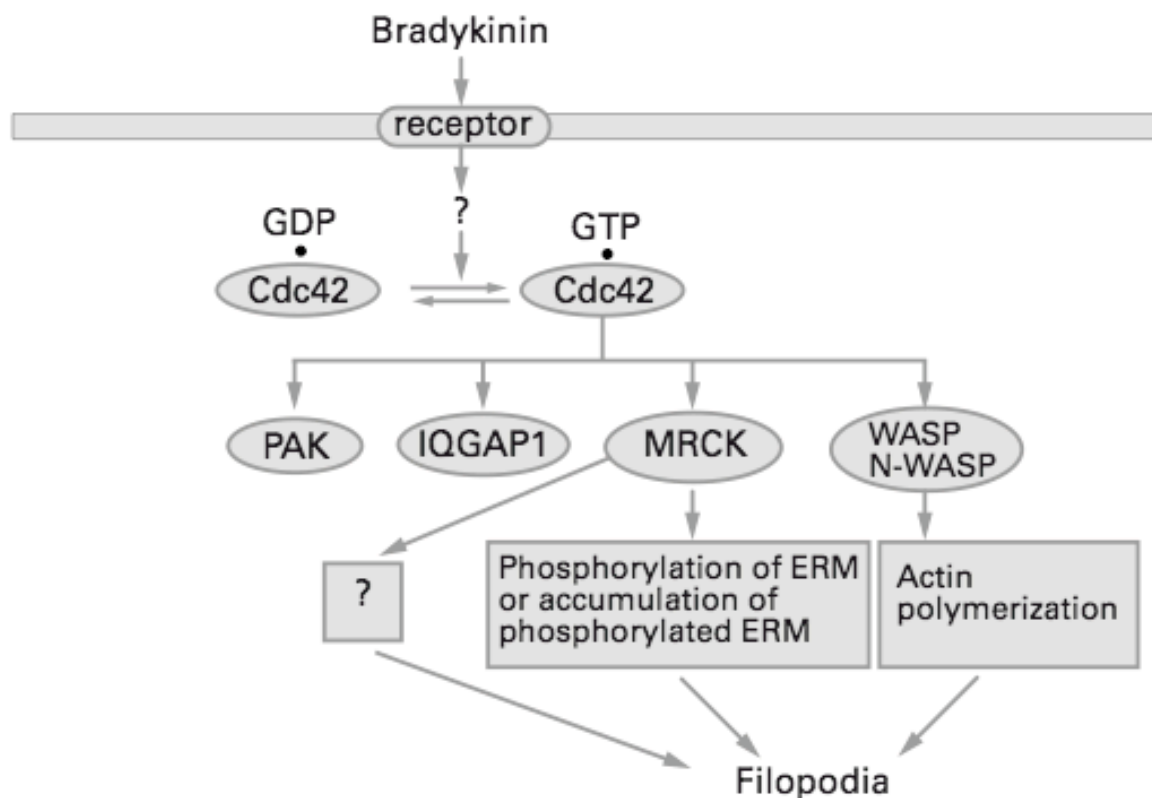


Figure 57 : Modèle de formation des filipodes par la voie de Cdc42 chez les fibroblastes NIH3T3. La bradykinine permet l'activation de Cdc42 qui interagit alors avec ses effecteurs. Parmi ces effecteurs, WASP/N-WASP régule la formation des fillipodes à travers l'induction de la polymérisation de l'actine. MRCK, un autre effecteur de Cdc42, permet la formation des fillipodes via la phosphorylation des ERM situées dans ces fillipodes (Nakamura *et al.*, 2000).

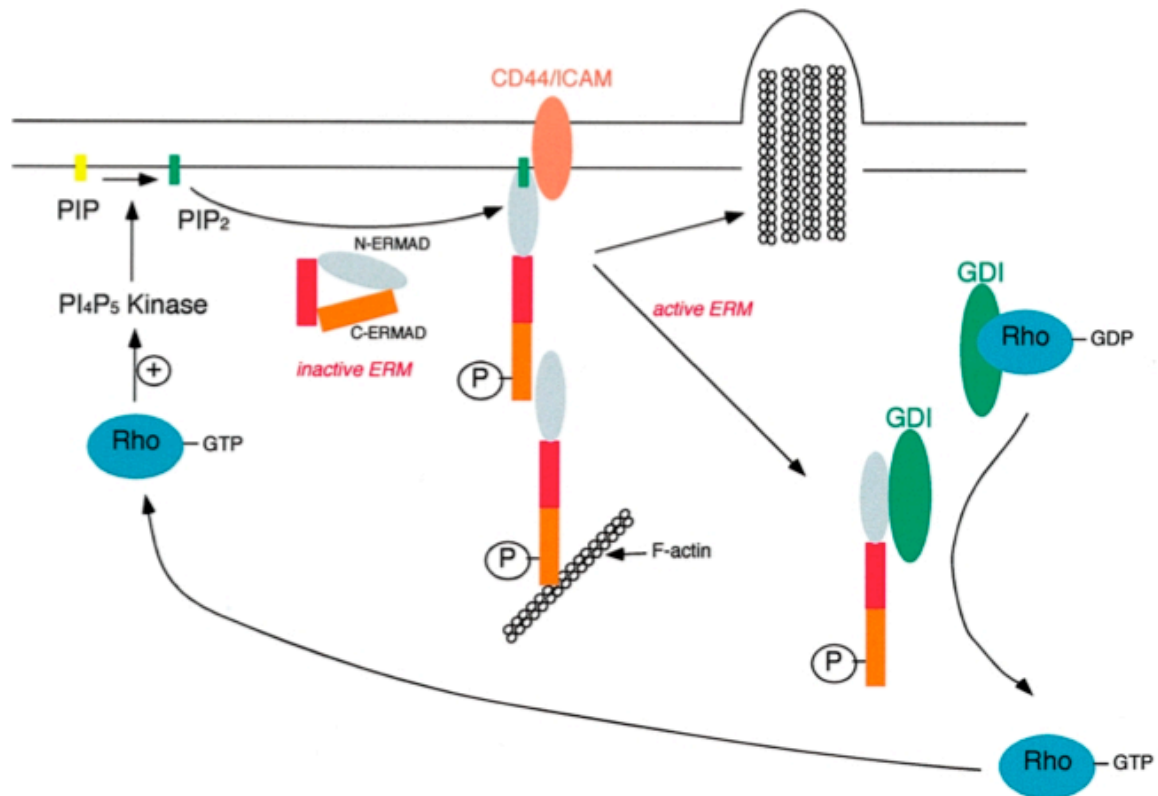


Figure 58 : Modèle d'activation de l'ezrine via la voie dépendante de Rho dans des fibroblastes. L'activation de PI₄P₅K par Rho induit l'augmentation de l'abondance de PIP₂. PIP₂ lie l'ezrine qui présente alors sa conformation ouverte. La phosphorylation de l'ezrine lui permet ensuite d'interagir avec des protéines régulatrices de Rho. L'abondance de Rho active augmente (Louvet-Vallee, 2000).

constitutivement Cdc42 et permet la formation de filipodes via la stabilisation de l'actine (figure 57) (Nakamura et al., 2000).

Cette possibilité de rôle simultané de l'eitrine et de Cdc42 n'a cependant jamais été testée dans la sénescence prématurée. Lorsqu'un anticorps spécifique permettra de détecter la forme phosphorylée de l'eitrine, nous pourrions étudier si son abondance augmente suite au traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ et si l'invalidation de Cdc42 contrecarre cette modification.

L'eitrine est également requise pour la transformation de fibroblastes régulée par la protéine Rho (Tran Quang et al., 2000). L'activation de PI₄P₅K (« phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase ») par Rho induit une augmentation de l'abondance de PIP₂ qui lie alors le domaine N-terminal de l'eitrine, lui confère sa conformation active et permet sa phosphorylation au niveau du domaine C-terminal (figure 58). L'eitrine permet d'augmenter l'abondance de Rho active en des sites proches de la membrane par son interaction avec des régulateurs de la voie de RhoA comme Dbl (une protéine à activité GEF pour les Rho GTP ases) ou une protéine à activité GDI. Ceci permet donc une boucle de rétro-action positive entre ces deux protéines (Batchelor et al., 2007; Hunter, 2004; Louvet-Vallee, 2000). Il a également été démontré que la translocation en membrane de l'eitrine est dépendante de son interaction avec Dbl via un mécanisme qui ne dépend pas de sa phosphorylation par les Rho kinases (Batchelor et al., 2007; Vanni et al., 2004).

Une comparaison récente de lymphocytes T de souris âgées avec ceux de souris jeunes montre que des réarrangements défectueux du cytosquelette et des lamellipodes sont reliés à des différences de niveau de phosphorylation de protéines de la famille de l'eitrine ou des modifications dans l'association des protéines de la famille de l'eitrine avec des protéines partenaires comme CD44 ou EBP50. Chez les souris âgées, les Rho GTPases ne présentent plus les activités régulatrices envers l'eitrine (Garcia et al., 2007).

I.2. HSP27

Nous démontrons ici que HSP27 est phosphorylée sur la sérine 82 au cours du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Ceci est en accord avec les résultats obtenus pour des cellules humaines de muscles lisses, des cellules endothéliales ou des kératinocytes exposés à un stress oxydatif où p38^{MAPK} phosphorylée induit à la fois l'augmentation de l'abondance de HSP27 et sa phosphorylation par les MAPKAP2/3 (MAP kinase-activated protein) (Garmyn et al., 2001; Huot et al., 1997; Negre-Aminou et al., 2002; Wong et al., 2000). Dans notre modèle, aucune variation de l'abondance protéique totale de HSP27 n'est cependant observée.

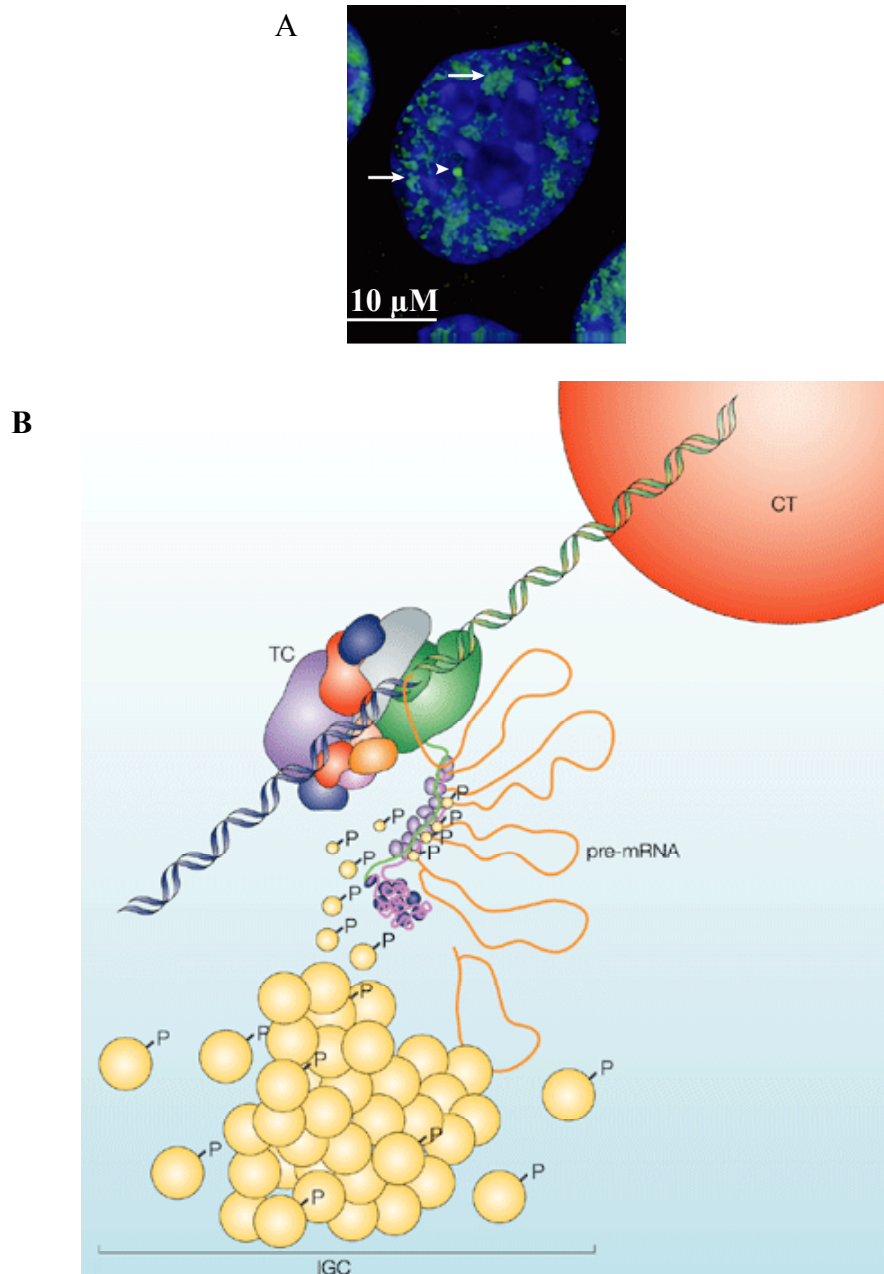


Figure 59 : Groupes de granules interchromatidiens.

A : Les facteurs d'épissage des ARNm sont marqués en vert par utilisation d'un anticorps spécifique reconnaissant les petites particules de ribonucléoprotéines nucléaires localisées dans le noyau cellulaire (marqué en bleu) selon un profil en taches (indiqués par les flèches). Ces taches sont présentes au niveau de régions nucléaires contenant peu ou pas d'ADN et hors du noyau.

B : Les groupes de granules interchromatidiens sont le résultat d'interactions protéine-protéine. Ces protéines jouent un rôle de facteur d'épissage alternatif ou permettent la transition de la télophase vers la phase G1 du cycle cellulaire. Un niveau basal d'échange de facteurs a lieu entre ces granules interchromatidiens et le nucléoplasme. Ce mécanisme est régulé par phosphorylation/déphosphorylation des protéines situées dans les granules. La phosphorylation de ces protéines permet leur transfert vers le nucléoplasme et permet leur recrutement vers des sites de transcription. CT, chromosome territory; IGC, interchromatin granule cluster; TC, transcription complex; pre-mRNA, pre-messenger RNA (Pour une revue : (Lamond et David, 2003)).

Ainsi, la phosphorylation de HSP27 observée chez les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 pourrait correspondre à une des composantes de la réponse adaptative des cellules après traitement avec H_2O_2 .

Il est important de déterminer si HSP27 phosphorylée dans les temps courts après le traitement est plutôt impliquée dans la stabilisation et/ou la dégradation de protéines oxydées ou plutôt dans la stabilisation des filaments d'actine. Il pourrait en effet s'agir d'un processus permettant aux cellules d'adhérer au substrat au cours de ce traitement et de bloquer l'apoptose. Une accumulation nucléaire de HSP27 en réponse à un choc thermique, à l'ischémie-réoxygénation, à l'irradiation par des UV a été observée dans certains types cellulaires. Par exemple, chez les kératinocytes, une localisation nucléaire de HSP27 représente un très bon marqueur de l'irritation de la peau (Pour une revue : (Ciocca and Calderwood, 2005)) ; (Borrelli et al., 2002; Boxman et al., 2002). Nous avons observé une localisation nucléaire ou péri-nucléaire de HSP27 à 3 jours après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Ces résultats supplémentaires sur sa localisation nucléaire ou péri-nucléaire ouvrent donc une piste quant au rôle de HSP27 après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

Il est proposé que HSP27 nucléaire permet de rétablir l'activité d'épissage des ARNm durant la phase de récupération qui suit le stress par sa localisation au niveau des groupes de granules interchromatidiens ou IGC (« interchromatin granule clusters ») durant la réponse face aux dommages. Ces IGC sont des sites de stockage d'ARNm codant pour des protéines requises pour une récupération efficace des cellules après le stress (figure 59) (Pour une revue : (Lamond and Spector, 2003)) ; (Bryantsev et al., 2007; Prasanth et al., 2005). Une controverse concerne la nécessité de la phosphorylation de HSP27 afin qu'elle puisse jouer son rôle de chaperonne. Il est donc également proposé que HSP27 pourrait agir en tant que chaperonne au sein du noyau (Bryantsev et al., 2007).

A côté de la réponse à court terme décrite ci-dessus, les cellules initient également des voies de signalisation afin d'induire des mécanismes de survie cellulaire. Nous avons montré par exemple la néosynthèse de HSP27. Celle-ci pourrait potentiellement permettre la polymérisation et la stabilisation de nouveaux filaments d'actine.

Au cours de l'étude protéomique, nous avons identifié HSP27 dans deux spots différents. Cela nous permet de penser que cette protéine est présente au moins sous deux isoformes différentes chez les FDHs IMR-90 à long terme après le traitement avec H_2O_2 . HSP27 peut présenter, comme expliqué ci-dessus, des phosphorylations ou encore l'oxydation de groupements thiols comme des S-thiolations au niveau de certains résidus cystéine (Eaton et al., 2002). En tous cas, les analyses par Western blot ne montrent pas de changement de

phosphorylation au niveau de la sérine 82, à 3 jours après le traitement. Il peut donc s'agir d'une autre modification post-traductionnelle ou d'une phosphorylation au niveau d'un résidu autre que la sérine 82.

I.3. La caldesmone

Lors de l'étude protéomique, nous avons identifié CaD parmi les spots d'intérêt. Puisque nous travaillons avec des FDHs, nous nous sommes naturellement tournés vers l'isoforme légère de CaD pour la suite de notre travail.

La néosynthèse de L-CaD permettrait peut-être une relocalisation de cette protéine vers des sites de formation de podosomes à 3 jours après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . L'hypothèse de l'augmentation du nombre de podosomes et l'implication de L-CaD dans ce processus lors de la sénescence prématurée reste cependant à vérifier.

Dans un premier temps, nous pourrions déterminer si L-CaD permet la stabilisation des fibres de stress d'actine. Selon les données de la littérature, sa surexpression entraîne la stabilisation des fibres de stress dans des cellules CHO alors qu'elle diminue ces fibres de stress dans des fibroblastes murins transformés NIH3T3 afin d'empêcher la transformation régulée par la protéine Ras. L'effet de la surexpression de CaD sur les fibres d'actine semble donc spécifique du type cellulaire étudié. Cet effet semble aussi dépendre du niveau d'abondance de son partenaire, la tropomyosine (Hai and Gu, 2006). En utilisant un siRNA spécifique pour empêcher l'expression de L-CaD, nous pourrions étudier l'implication de cette protéine dans l'augmentation des fibres de stress d'actine lors de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 .

Nous avons démontré pour la première fois que L-CaD est phosphorylée sur son résidu sérine 789 après le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . L'abondance de cette isoforme semble augmenter de manière biphasique, tout d'abord durant le stress et ensuite entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour après le traitement avec H_2O_2 . Il a été montré dans des cellules musculaires lisses que CaD joue un rôle différent dans la modulation de la taille des podosomes selon qu'elle est phosphorylée ou non (Gu et al., 2007). L'étude des podosomes n'a jamais été réalisée chez des cellules en sénescence prématurée. Si la formation de podosomes est observée chez les FDHs IMR-90, il faudrait alors étudier le rôle de phospho-L-CaD dans ces structures.

Une hypothèse propose que phospho-CaD reste attachée aux petits filaments d'actine dans le cytosol des cellules mitotiques, et constitue des centres de nucléation afin de faciliter le réassemblage des fibres après la division cellulaire (Kordowska et al., 2006; Mak et al., 1991;

Yamakita et al., 1992). Le résidu 789 étant phosphorylé chez les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 , et ces cellules étant plus étalées à ce moment, il se peut que cette modification post-traductionnelle permette l'interaction de L-CaD à l'actine. Une étude que nous avons réalisée en microscopie confocale révèle que phospho-L-CaD est plus abondante au niveau des prolongements cellulaires des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée après traitement avec H_2O_2 . Ces résultats nous permettent donc de penser que phospho-L-CaD pourrait jouer un rôle dans la morphologie étalée observée lors de la sénescence prématurée. Des études complémentaires sont cependant nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Nous avons mis en évidence l'implication de Cdc42 et de $p38^{MAPK}$ dans cette phosphorylation de L-CaD sur la sérine 789 observée 4 jours après le traitement.

L'implication de $p38^{MAPK}$ a déjà été étudiée par d'autres chercheurs pour son implication dans la phosphorylation de L-CaD dans des cellules endothéliales traitées avec de la thrombine ou avec de la toxine de *bordetella pertussis* (Borbiev et al., 2004; Garcia et al., 2002). Il serait donc intéressant de savoir si Cdc42, $p38^{MAPK}$ et/ou L-CaD font partie d'un mécanisme commun conduisant à la formation de podosomes chez les FDHs IMR-90. En effet, il est possible que N-WASP couple l'activation de Cdc42 à la formation de podosomes chez les FDHs, comme démontré pour des cellules endothéliales (Hai and Gu, 2006). Selon la littérature, la formation des podosomes semble en effet dépendre de plusieurs mécanismes dont les Rho-GTPases comme Rac1, Cdc42 et RhoA. Leur implication dans ce processus semble évidente, mais leur mode d'action dépend du type cellulaire (Linder and Kopp, 2005; Moreau et al., 2003).

Nous ne savons pas quelle protéine est responsable de la phosphorylation de L-CaD durant le traitement. Il a déjà été démontré par d'autres chercheurs que ERK, PAK1, cdk1 et PKC peuvent être impliquées (D'Angelo et al., 1999; Eppinga et al., 2006; Gerthoffer, 2005; Hedges et al., 2000; Kordowska et al., 2006; McManus et al., 2000; Yamboliev et al., 2000). Bien que les protéines ERK soient activées par phosphorylation 1 jour après le traitement avec H_2O_2 , et qu'elles ne sont pas responsables de la phosphorylation de L-CaD à long terme (résultats non montrés), il serait intéressant d'étudier leur implication durant le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

Chez les cellules musculaires lisses, il a été montré précédemment que la phosphorylation de CaD sur la sérine 789 est induite par l'association de cette protéine avec la PKC α phosphorylée. Cette isoforme interagit alors avec phospho-HSP27 et se dissocie de la tropomyosine (Somara and Bitar, 2006). Puisque nous avons démontré que L-CaD et HSP27 sont phosphorylées durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 , ce mécanisme

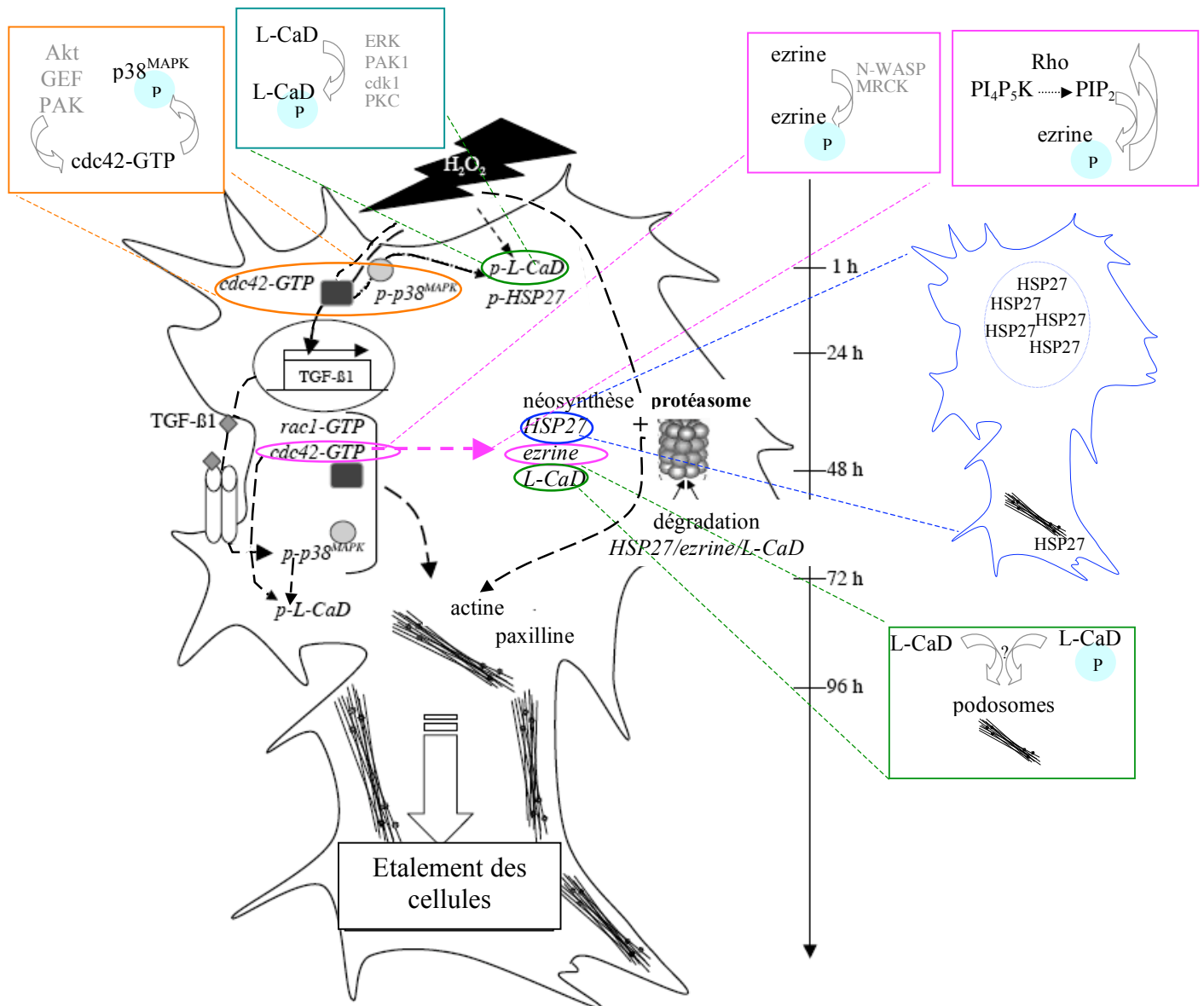


Figure 60: Modèle hypothétique de l'effet de H_2O_2 sur la morphogénèse sénescence des fibroblastes IMR-90.

L'activation rapide de Cdc42 et de p38^{MAPK} permet l'activation de HSP27 et l'augmentation de la transcription du TGF- β 1. Cela induit la réactivation de p38^{MAPK} qui, avec Cdc42, permet la phosphorylation de la L-CaD et la réorganisation du cytosquelette d'actine et de paxilline. En parallèle, H_2O_2 induit la néosynthèse de l'ezrine, de la L-CaD et de HSP27, qui pourraient également être impliquées dans la réorganisation du cytosquelette.

Les mécanismes hypothétiques complémentaires de ce travail sont présentés en couleur sur le pourtour de la représentation schématique du fibroblaste. Les protéines Akt, PAK ou des protéines à activité GEF pourraient être responsables de l'activation de Cdc42 durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Différentes protéines pourraient intervenir dans la phosphorylation de la L-CaD durant le traitement, comme les protéines ERKs, PAK1, PKC ou encore cdk1. En ce qui concerne les variations ayant lieu à long terme après le traitement, il serait intéressant d'étudier l'état de phosphorylation de l'ezrine et l'implication de Cdc42 (via divers intermédiaires) pour cette modification. Il serait également complémentaire d'étudier le rôle de HSP27 dans le noyau et de la phospho-L-CaD/L-CaD dans la formation de podosomes à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

d'interaction est donc possible lors de la sénescence prématurée des FDHs IMR-90.

Toutes ces données suggèrent que L-CaD joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette en interagissant avec de nombreux partenaires protéiques.

D'autres investigations sont donc nécessaires afin d'éclaircir ces mécanismes régulateurs de L-CaD et de sa phosphorylation dans le cadre de la sénescence prématurée induite par un traitement sublétal des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ et de déterminer quel est le rôle de cette protéine dans la stabilisation du cytosquelette d'actine et du changement de morphologie cellulaire.

I.4. p38^{MAPK}, Cdc42 et Rac1

Nous avons montré que Cdc42 est impliquée dans la phosphorylation précoce de p38^{MAPK} et de HSP27, dans l'augmentation de l'abondance de transcrits du TGF-β1 et dans les modifications morphologiques des FDHs IMR-90 suite au traitement avec H₂O₂ à concentration sublétale. Une boucle de rétro-action positive semble relier p38^{MAPK} et Cdc42 puisque Cdc42 n'est plus activée après l'invalidation de p38^{MAPK}. Cdc42 participe donc aux changements dépendant du TGF-β1 observés chez les FDHs IMR-90 en sénescence prématurée. Nous avons également mis en évidence que Rac1 est activée à plus long terme et est également impliquée dans les changements morphologiques.

Nous ne savons cependant pas ce qui permet l'activation de p38^{MAPK} et/ou Cdc42 suite au traitement avec H₂O₂, ni laquelle de ces 2 protéines est activée en premier. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous selon les données de la littérature (figure 60).

Il est bien connu que l'activation/inactivation de Rac1 et Cdc42 dépend essentiellement de trois classes de protéines : les GEFs (« guanine nucleotide exchange factor ») qui favorisent l'échange du GDP par un GTP, les GAPs (« GTPases activating protein ») qui stimulent l'activité intrinsèque des protéines Rho à hydrolyser le GTP, et les GDIs (« guanine nucleotide dissociation inhibitor ») qui bloquent la dissociation du GDP. Rappelons que nous avons mis en évidence une néosynthèse d'une GAP-Cdc42 à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Il serait donc possible que l'inactivation d'une protéine GAP ou GDI ou au contraire l'activation d'une protéine GEF durant le traitement avec H₂O₂, soit à l'origine de l'activation de Cdc42 et donc de p38^{MAPK} et HSP27.

Selon la littérature, l'activité des GEFs, par exemple la famille des protéines Cool-Pix (« cloned-out of library-PAK-interacting protein »), est dépendante de leur association directe avec Akt (Yoshii et al., 1999). Nous avons montré que Akt est phosphorylée sur la sérine 473 à 1 jour

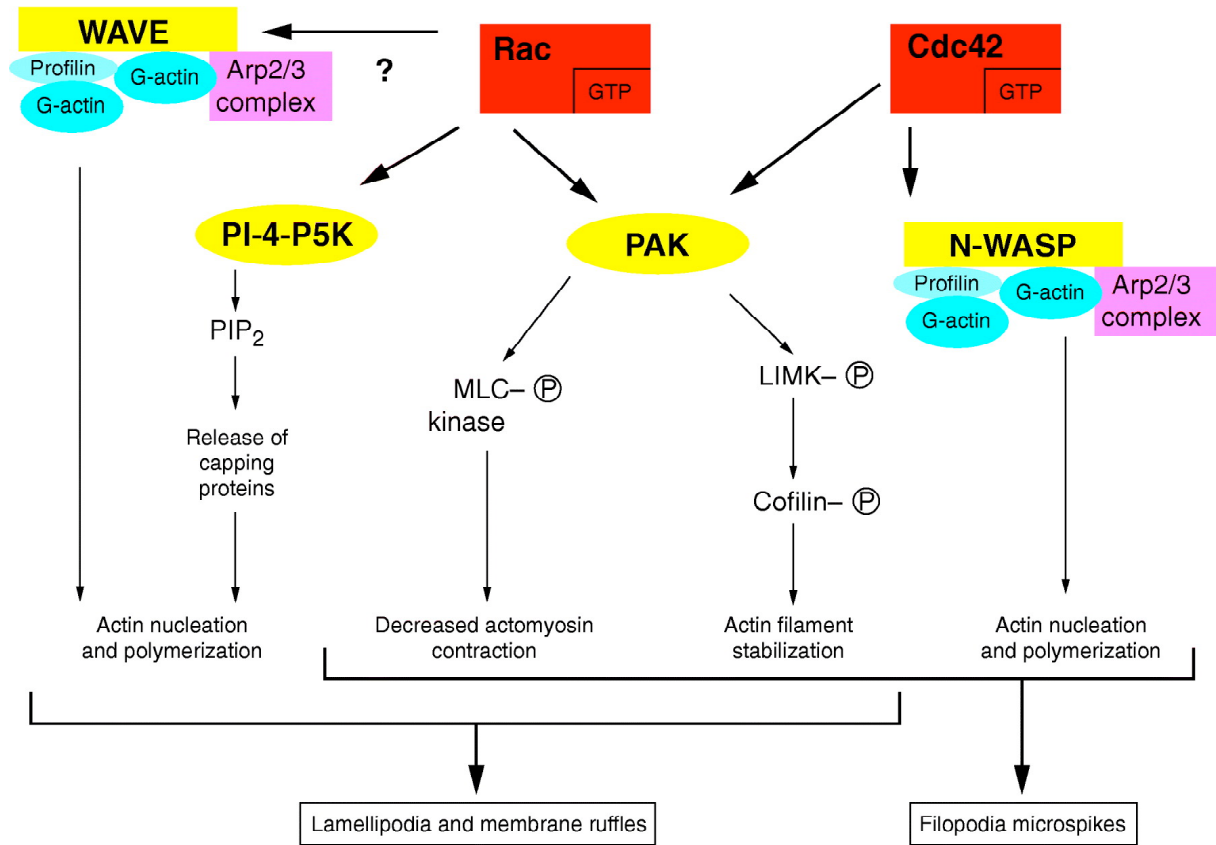


Figure 61 : Voies de signalisation induites par Rac et Cdc42 (en rouge), et qui contribuent à la formation de lamellipodes et filipodes constitués d'actine (Bishop et Hall, 2000).

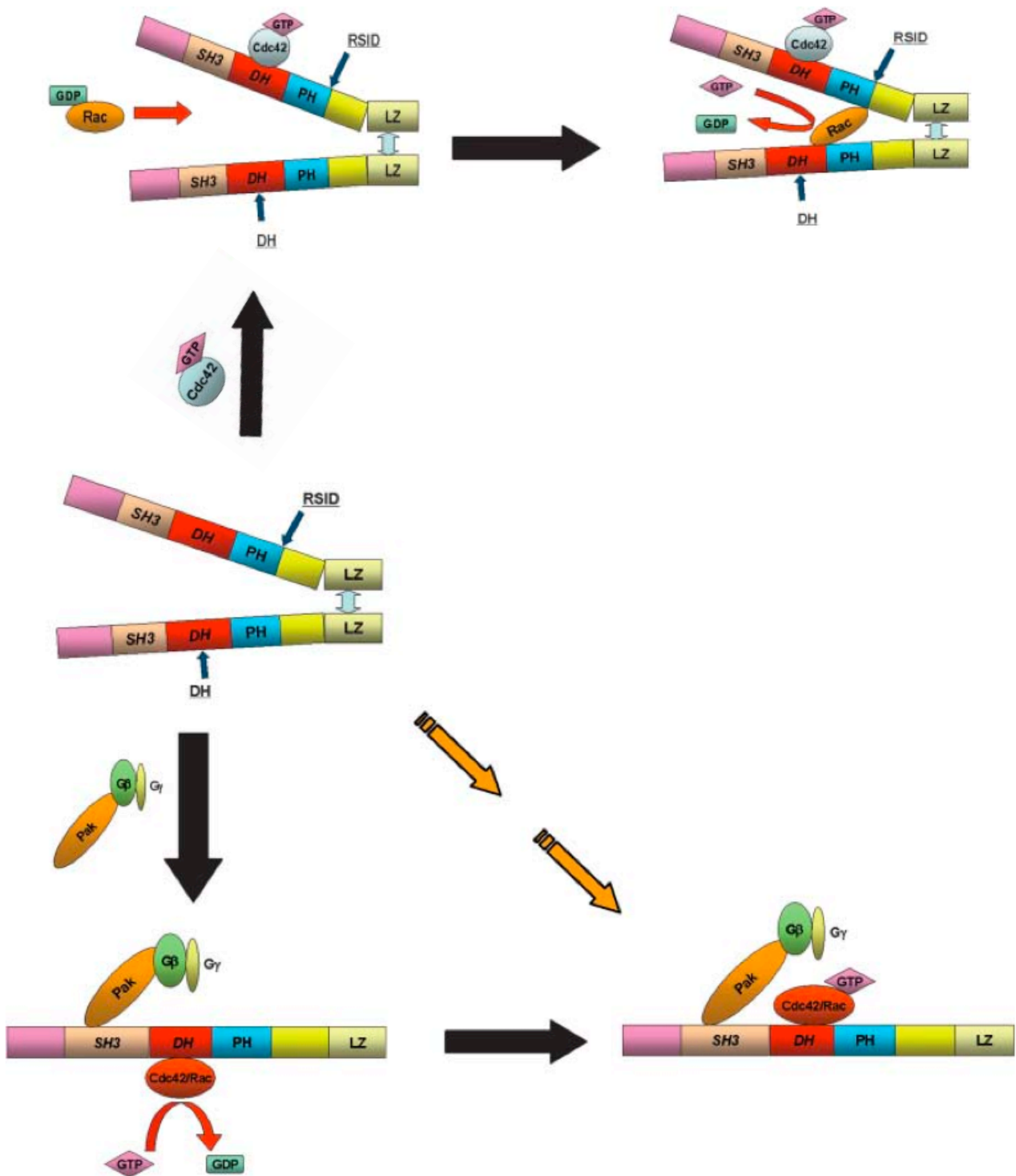


Figure 62 : Modèle d'activation et de stimulation de l'activité de Cool-2 GEF. L'équilibre monomère-dimère régule son activité GEF. En absence d'autre partenaire, le dimère Cool-2 peut agir comme protéine à activité GEF pour Rac1. La liaison de Cdc42 active à Cool-2 entraîne un réarrangement de la conformation de Cool-2 et favorise une meilleure liaison avec Rac1, permettant un échange du GDP en GTP de manière plus rapide au niveau de Rac1. Rac1 activée inhibe alors l'activité GEF de Cool-2. Si le dimère de Cool-2 est bloqué, par exemple par la liaison d'un complexe PAK3-Gβγ, l'échange du nucléotide par l'activité GEF de Cool-2 est possible pour Rac1 et Cdc42. La forme activée de Cdc42 lie Cool-2 monomérique de façon compétitive avec Rac1, inhibant ainsi l'activité GEF de Cool-2 pour l'activation de Rac1, et inversement (d'après Baird *et al.*, 2005).

après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Il serait donc intéressant de déterminer, dans notre modèle, si Akt joue un rôle dans l'activation de Cdc42 et/ou Rac1 puisque l'activation de Cdc42/Rac1 et la phosphorylation de Akt sont synchronisées.

De plus, il a été montré précédemment que les protéines de la famille de Cool-Pix permettent également l'activation des protéines PAK, cibles majeures de Rac1 et Cdc42 (figure 61) (Bishop and Hall, 2000). Les protéines Cool-Pix présentent des effets fonctionnels spécifiques et la protéine de cette famille la mieux décrite est β -Pix (Feng et al., 2002). D'après d'autres chercheurs, β -Pix active Cdc42 et joue un rôle dans l'activation de $p38^{MAPK}$ via une voie impliquant Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6, ce qui permet de réorganiser le cytosquelette d'actine chez les fibroblastes NIH3T3. PAK permet alors d'induire les changements d'expression génique, une réorganisation du cytosquelette d'actine et des changements morphologiques induits par Cdc42 et Rac1. Chez ces fibroblastes murins transformés, il a été montré précédemment que β -Pix peut interagir avec PAK au sein d'un complexe contenant la paxilline, Nck et p95PKL (« paxillin-kinase linker »). Cette dernière protéine appartient à la famille des protéines ARF, qui jouent un rôle direct quant à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ceci permettrait donc de faire le lien entre les protéines à activité GTPase et le cytosquelette d'actine (Lee et al., 2001).

Dans la littérature, une hypothèse propose que Rac1, en compétition avec PAK pour la liaison avec β -Pix, est maintenue inactive dans le cytosol par son interaction avec un GDI. β -Pix permet l'activation de Cdc42, qui induit la phosphorylation et donc la dissociation de PAK avec β -Pix. Rac1 peut alors interagir avec β -Pix, et le GDI phosphorylé par PAK se dissocie de Rac1. Cette GTPase activée par β -Pix permet alors la réorganisation du cytosquelette d'actine (figure 62) (Baird et al., 2005; ten Klooster et al., 2006).

De plus, il est connu que PAK1 peut activer les LIMK (figure 61). Ces protéines pourraient également faire le lien entre Cdc42 et le cytosquelette d'actine dans les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 puisque les LIMK permettent la phosphorylation de la cofiline, ce qui bloque la dépolymérisation de l'actine et donc induit l'accumulation de ses filaments (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). Le « pool » de cofiline active est vital pour la déstabilisation du cytosquelette d'actine et est contrôlé par phosphorylation, notamment par les LIMK, des phosphatases ou la protéine Rac1 (Yang et al., 1998). Ces signaux antagonistes peuvent converger vers la (dé)phosphorylation de la cofiline afin de contrôler la dynamique des filaments d'actine (Arber et al., 1998). Il a été montré précédemment que la migration de fibroblastes en monocouche qui ont été soumis à un test de blessure (destruction partielle de la monocouche) est supprimée lorsque LIMK-1 ou la cofiline sont surexprimées (Arber et al., 1998).

De plus, de récentes observations réalisées par d'autres chercheurs démontrent que des voies interférentes, et dépendantes du système rédox de la cellule, existent entre les différentes GTPases. Bien que ce lien ne soit pas universel, l'activité de Rac1 est souvent inversement proportionnelle à l'activité de RhoA (Pour une revue : (Finkel, 2006)). La production de ROS induite par Rac1 module l'activité des protéines tyrosines phosphatases de faible poids moléculaire, ce qui permet l'activité de p190-Rho-GAP, et donc celle de RhoA (Pour une revue : (Finkel, 2006)).

En perspective de cette partie du travail, nous pourrions aussi étudier le rôle de RhoA, comme nous l'avons fait pour Rac1 et Cdc42. Ceci nous permettrait d'avoir une vue générale concernant ces GTPases les plus décrites au sein de leur famille. Selon la littérature, RhoA est connue pour induire les fibres de stress d'actine, phénomène observé dans notre modèle de sénescence prématurée. Puisque Rac1 et Cdc42 ne sont pas synchronisées au niveau de leur activation après le traitement des FDHs avec H_2O_2 , il se peut que RhoA joue aussi un rôle.

Il a de plus été montré par d'autres chercheurs qu'un lien antagoniste existe entre Rac1 et Cdc42 dans la génération de ROS chez des fibroblastes. Alors que Rac1 permet la production de ROS grâce à son interaction avec la NADPH oxydase, Cdc42 bloque cette interaction et donc la production de ROS qui en résulte (Diebold et al., 2004). Cette information permettrait de compléter nos données concernant ces Rho-GTPases. Ainsi, bien que nous pourrions penser que Rac1 et Cdc42 agissent dans des voies parallèles, il se pourrait que ces voies soient antagonistes également dans notre modèle. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi Rac1 est inactive durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 alors que Cdc42 est active à ce moment. A plus long terme après traitement avec H_2O_2 , par contre, on pourrait observer une collaboration entre ces deux voies, ce qui induirait une altération de la morphologie cellulaire.

Toutes ces hypothèses qui permettraient de faire le lien entre p38^{MAPK}, Cdc42, Rac1 et le cytosquelette d'actine restent cependant à vérifier dans notre modèle. Néanmoins, nous savons déjà que la forme phosphorylée de PAK1 est deux fois plus abondante à 3 jours après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 (résultats non montrés). Ceci a été mis en évidence par Western blot en comparant les conditions contrôles et en sénescence prématurée. Est-ce cette différence permet à PAK1 de participer à la réorganisation de l'actine ? Ceci reste à déterminer, mais ces résultats nous offrent une hypothèse quant à la stabilisation de l'actine par Rac1 à long terme après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

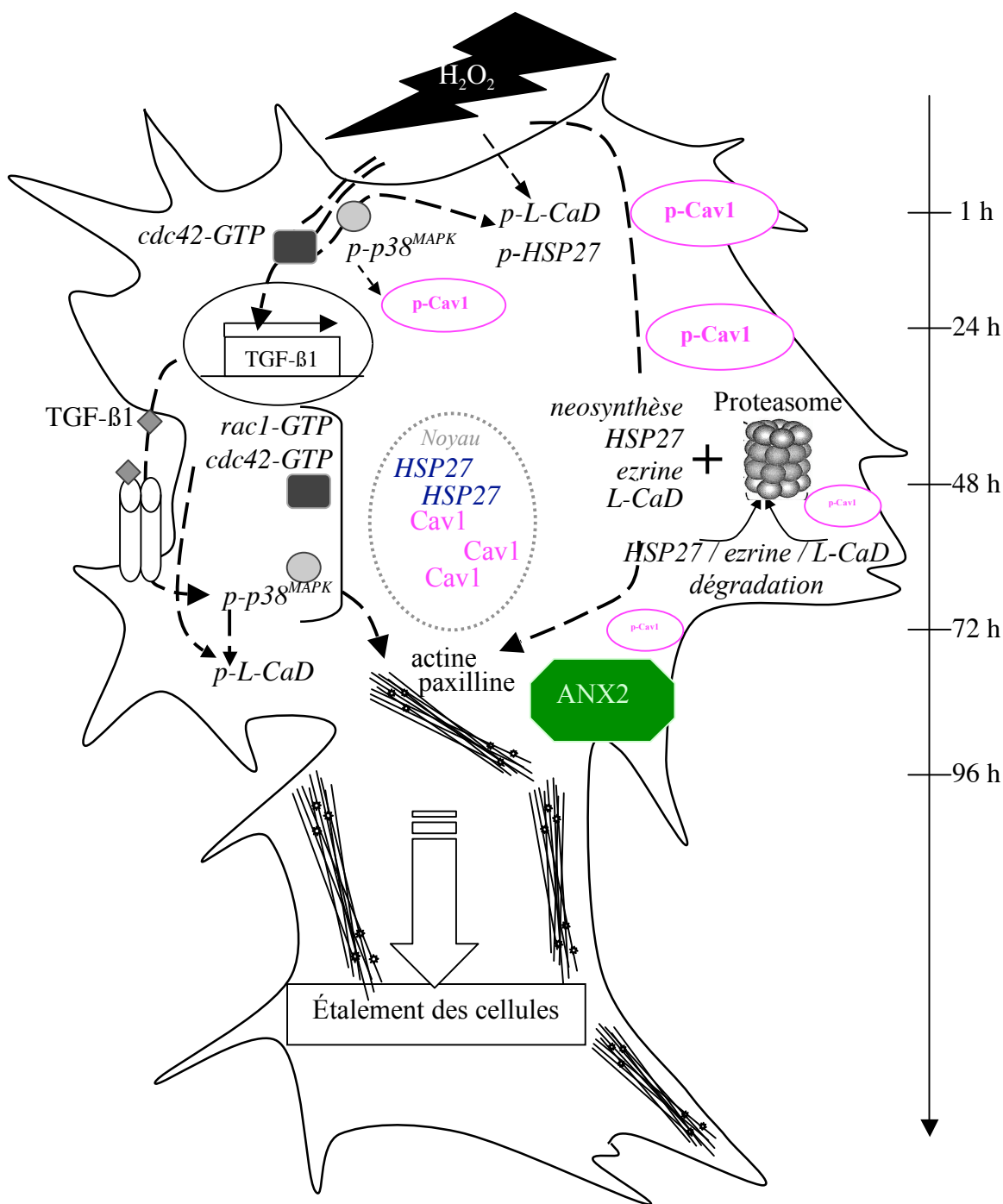


Figure 63 : Modèle hypothétique de l'effet de H_2O_2 sur la morphogenèse sénescence prématurée des fibroblastes IMR-90. L'implication de Cdc42, $p38^{MAPK}$, HSP27, TGF- $\beta 1$, L-CaD et la néosynthèse de l'ezrine, la L-CaD et HSP27 permettraient de réorganiser le cytosquelette d'actine et de paxilline. L'abondance augmentée de l'annexine 2 pourrait également jouer un rôle dans ce processus. Ce changement de morphologie permettrait peut-être à la cellule de migrer plus facilement. La cavéoline 1 n'a pu être démontrée impliquée dans l'altération de la morphologie mais pourrait plutôt jouer un rôle au niveau du noyau.

II. Conclusion concernant les protéines identifiées lors de l'étude protéomique après marquage métabolique

Dans notre modèle, p38^{MAPK} permet la phosphorylation de HSP27 au cours du traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ mais également la phosphorylation de L-CaD à 4 jours après ce traitement. En connaissant les fonctions respectives de HSP27 et L-CaD dans l'organisation du cytosquelette d'actine, nous proposons un modèle selon lequel p38^{MAPK} exerce tout d'abord un effet sur la polymérisation de l'actine via la phosphorylation de HSP27, ainsi qu'un effet à plus long terme sur la stabilisation de fibres de stress via la phosphorylation de L-CaD (figure 63). HSP27 peut également jouer un rôle de chaperonne dès le début du traitement des cellules. À long terme après traitement avec H₂O₂, HSP27 pourrait participer à l'assemblage des filaments d'actine ainsi que jouer un rôle au sein du noyau.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence des événements dépendants et indépendants du TGF-β1 qui sont induits après le traitement de FDHs IMR-90 avec H₂O₂. En effet, la néosynthèse de protéines du cytosquelette telles que l'eitrine, L-CaD ou HSP27 est augmentée entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Ces changements permettraient également de comprendre comment apparaît le phénotype de la sénescence prématurée et notamment la morphologie étalée. Les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne l'eitrine, L-CaD et HSP27 permettent de proposer une hypothèse selon laquelle des dislocations auraient lieu au sein de complexes de protéines telles que L-CaD, l'eitrine, et HSP27 et le cytosquelette d'actine entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement avec H₂O₂. De façon synchronisée, la synthèse de nouvelles molécules d'eitrine, de L-CaD et de HSP27 auraient lieu. Ces nouvelles protéines seraient ensuite attachées au cytosquelette de manière à permettre les changements d'organisation d'actine en des sites bien spécifiques et modifier ainsi la morphologie des FDHs IMR-90.

Enfin, grâce à cette étude protéomique, nous avons aussi mis en évidence des changements de niveau d'expression protéique propres à la stimulation avec du TGF-β1. Ces protéines n'ont pas été étudiées au cours de ce travail mais permettent néanmoins d'élargir la liste déjà établie des protéines dont l'abondance change en réponse au TGF-β1.

Une étude transcriptomique avec *a priori* a été réalisée à partir de FDHs IMR-90 h-TERT (transfectés avec la sous-unité catalytique de la télomérase) afin de comparer la condition contrôle et traitée avec H₂O₂ (Zdanov et al., 2006). Cette étude montre une augmentation d'abondance de 17 et 20 transcrits respectivement à 24 h et à 72 h après le traitement des FDHs IMR-90 h-TERT avec H₂O₂ à une concentration sublétales. De même, 36 et 17 transcrits

présentent une diminution d'abondance respectivement à 24 h et à 72 h après le traitement avec H_2O_2 . De plus, il semble que l'abondance de respectivement 19 et 16 transcrits est dépendante de p38^{MAPK} respectivement à 24 h et 72 h après le traitement avec H_2O_2 . Nous ne retrouvons pas de candidat commun avec cette étude parmi les protéines identifiées lors de notre étude protéomique. Diverses raisons, comme un effet différentiel de la télomérase sur l'expression génique des FDHs (de Magalhaes et al., 2004), la stabilité des ARNm ou des protéines, les temps d'analyse après le traitement, le fait que des corrélations entre changements d'abondance d'ARNm et de protéines ne sont pas toujours observées, ainsi que les seuils d'induction choisis dans les deux études, permettent d'expliquer l'absence de recouvrement entre ces deux études.

Une étude protéomique a été réalisée précédemment au laboratoire sur des FDHs WI-38 contrôles et en sénescence prématurée induite avec du *t*-BHP ou de l'éthanol ainsi que sur des FDHs WI-38 jeunes et vieux (Dierick et al., 2002b). Cette étude était également basée sur la néosynthèse protéique mise en évidence par l'utilisation de méthionine radioactive [³⁵S]. Les protéines identifiées lors de cette étude ont été citées dans l'introduction. Parmi ces protéines, seules l'actine et HSP27, présentant une augmentation de néosynthèse respectivement dans les FDHs WI-38 en sénescence prématurée induite par *t*-BHP ou par éthanol et dans les FDHs WI-38 en sénescence répllicative par rapport aux FDHs WI-38 jeunes contrôles, sont communes avec notre étude de la néosynthèse protéique des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée induite par H_2O_2 . Bien que nous ayons étudié la néosynthèse protéique des FDHs IMR-90 entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement H_2O_2 , comme cela a été réalisé pour les FDHs WI-38, il n'est pas étonnant de ne retrouver que peu de protéines communes entre ces deux études. Les FDHs WI-38 et les FDHs IMR-90 sont des souches cellulaires différentes. Des protéines peuvent présenter une augmentation de néosynthèse suite à un stress et être impliquées dans l'apparition de la sénescence alors que d'autres protéines appelée « cicatrices moléculaires » peuvent être spécifiques de chaque type de stress (Brack et al., 2000).

Nos résultats sont donc complémentaires aux études réalisées auparavant sur la sénescence prématurée.

Dans le but de compléter la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de Cdc42, p38^{MAPK}, Rac1 et L-CaD, nous nous sommes ensuite penchés sur l'étude de la cavéoline 1 lors de la sénescence prématurée des FDHs IMR-90 induite par H_2O_2 .

III. Etude de la cavéoline 1 lors de la sénescence prématurée

Nous avons montré que l'abondance protéique totale de Cav1 dans des extraits cytoplasmiques est plus importante à partir de 1 jour après le traitement des FDHs avec H_2O_2 . La

forme phosphorylée, sur la tyrosine 14, est plus abondante dans ces conditions, quel que soit le moment étudié après le traitement et est corrélée avec l'augmentation de Cav1 totale à partir de 1 jour après le traitement. Nous avons montré que cette phosphorylation de Cav1 durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 est dépendante de $p38\alpha^{MAPK}$. D'autres études portant sur des fibroblastes murins NIH3T3 ou des cellules endothéliales traitées avec H_2O_2 ont montré que cette phosphorylation de Cav1 dépendante de $p38^{MAPK}$ est réversible si H_2O_2 n'est plus présent dans le milieu extracellulaire (Cho et al., 2004; Volonte et al., 2001). Bien que nous n'ayons montré l'implication de $p38\alpha^{MAPK}$ que dans les temps courts, la phosphorylation de Cav1 est maintenue jusqu'à 3 jours après le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Puisque nous avons observé un lien entre Cdc42 et $p38\alpha^{MAPK}$ dans la première partie du travail, nous avons également étudié l'effet de l'inactivation de Cav1 sur l'activation de Cdc42 durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Nous n'avons pas observé d'implication de Cav1 sur l'activité de Cdc42 (résultats non montrés). L'activation de Cdc42 par $p38\alpha^{MAPK}$ ne dépend donc pas de Cav1.

Avant que nous commencions cette étude, d'autres chercheurs ont tenté d'éclaircir la fonction de Cav1 dans l'établissement de la sénescence. Par exemple, une étude de la sénescence répliquative de fibroblastes de peau a mis en évidence que l'abondance des protéines FAK et RhoA augmente dans les cavéoles. De plus, dans ces cellules sénescents, Rac1 et Cdc42 interagissent directement avec Cav1 (Cho et al., 2004). Ces auteurs proposent donc que, via ces interactions avec les GTPases, Cav1 pourrait induire la morphologie altérée des cellules en sénescence répliquative. Toutefois, il semble que Cav1 ne soit impliquée ni dans l'altération de la morphologie de FDHs IMR-90 en sénescence prématurée, ni dans l'activation de Cdc42 durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

D'autres auteurs ont démontré l'implication de Cav1 dans les mécanismes induits lors du traitement de fibroblastes murins transformés NIH3T3. Ils décrivent le rôle de Cav1 dans l'arrêt de prolifération irréversible via l'activation de $p21^{WAF-1}$, la morphologie cellulaire étalée des cellules et l'augmentation de cellules positives pour la SA- β gal (Volonte et al., 2002).

Contrairement à ces résultats, nous démontrons que Cav1 n'intervient pas dans l'apparition de caractéristiques de la sénescence. Nous pouvons donc conclure que le rôle de Cav1 dans l'établissement de la sénescence prématurée est dépendant soit de l'espèce d'origine des fibroblastes étudiés, soit de l'immortalisation des cellules NIH3T3, soit des deux.

Nous avons démontré que Akt et les protéines ERK sont phosphorylées à long terme après traitement des FDHs IMR-90 avec H_2O_2 . Cav1 n'est pas impliquée dans ces modifications post-

traductionnelles. Dans la littérature, les protéines ERK ont été présentées comme régulateurs négatifs de la voie du TGF- β 1 par interaction ou modification des Smads (Razani et al., 2001). De plus, il a été montré précédemment que Cav1 interagit avec le T β R-I de manière à bloquer la phosphorylation de Smad2, l'interaction de Smad2 avec Smad4 ainsi que leur translocation vers le noyau. Il serait donc intéressant d'étudier la voie des Smads. Si cette voie ne semble pas activée dans le modèle de FDHs en sénescence prématurée induite par H₂O₂, nous pourrions alors analyser l'implication de Cav1 et des ERK dans cette inhibition. Dans le cas d'une régulation négative, Cav1 et les protéines ERK pourraient agir en parallèle.

Néanmoins, nous avons mis en évidence une abondance protéique élevée de Cav1 dans les extraits nucléaires récoltés 1 jour après le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂. Selon la littérature, en fonction du type cellulaire étudié, Cav1 peut présenter des localisations autres que membranaires, par exemple dans les mitochondries, la lumière du réticulum endoplasmique, dans les vésicules de sécrétion, etc. (Pour une revue : (Quest et al., 2004)). D'autres chercheurs ont déjà observé Cav1 au sein de noyaux de cellules de carcinomes, ou de cellules endothéliales (Feng et al., 1999; Sanna et al., 2007). Néanmoins, notre étude est la première à présenter une localisation nucléaire de Cav1 dans des FDHs.

Dans la perspective de cette étude, il sera intéressant de déterminer si Cav1 nucléaire est capable de lier une séquence de l'ADN humain et jouer un rôle activateur ou répresseur de la transcription lors de la sénescence prématurée. Il a déjà été démontré par Sanna et son équipe que Cav1 nucléaire de cellules de carcinomes ovariens peut lier la séquence promotrice de la cycline D1 et exercer une fonction de répression de la transcription de la cycline D1 (Sanna et al., 2007). Cependant, des études montrent que l'abondance des transcrits de la cycline D1 augmente lors de la sénescence répllicative ou de la sénescence prématurée induite par des stress répétés aux UVB (Berardi et al., 2003; Borlon et al., 2007; Debacq-Chainiaux et al., 2005; Fukami et al., 1995). Il a déjà été montré qu'un niveau excessif de la cycline D1 réprime la prolifération cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN et l'activité de CDK2 (Berardi et al., 2003). Si l'abondance des transcrits de la cycline D1 augmentent également lors de la sénescence prématurée induite par H₂O₂, il est toujours possible que Cav1 exerce une fonction de répression (ou d'activation) de la transcription d'autres gènes.

Selon la littérature, Cav1 peut être transloquée dans le noyau par diffusion simple ou en association avec des protéines chaperonnes, dans divers types cellulaires (Joliot et al., 1997; Uittenbogaard et al., 1998). Nous pourrions donc imaginer Cav1 en association avec HSP27 dans

les noyaux de FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 . Des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes de translocation de Cav1 vers le noyau chez les FDHs IMR-90.

Afin d'éclaircir le rôle de Cav1 dans l'établissement de la sénescence prématurée de FDHs, nous pourrions invalider l'expression de cette protéine grâce à l'outil des siRNA avant de soumettre les FDHs IMR-90 à un traitement subléthal avec H_2O_2 et réaliser une étude protéomique ou transcriptomique. Nous pourrions ainsi cibler la suite des études sur certains candidats intéressants dans le cadre de la sénescence prématurée de FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 . La surexpression de Cav1 dans les IMR-90 avant le traitement avec H_2O_2 nous permettrait de déterminer si l'augmentation d'abondance protéique de Cav1 observée après traitement avec H_2O_2 est une cause (inducteur) ou une conséquence (protecteur) de l'apparition de la sénescence prématurée.

Le rôle de Cav1 dans l'établissement de la sénescence prématurée n'est pas semblable dans des FDHs murins transformés et dans des FDHs humains normaux. Il a été montré précédemment que la surexpression d'autres protéines, comme Ras, n'induisait pas les mêmes conséquences au sein de cellules transformées ou normales (Serrano et al., 1997).

Dans le cadre de notre étude, nous pouvons proposer que Cav1, localisée en membrane plasmique, jouerait plutôt un rôle au niveau de la signalisation immédiatement après le début du traitement des cellules avec H_2O_2 alors qu'elle aurait une fonction au sein des noyaux dans les jours qui suivent ce traitement.

Cav1 n'a pas été identifiée lors de l'analyse par 2DGE. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, toutes les protéines déposées sur le gel de première dimension ne pénètrent pas dans celui-ci. De plus, Cav1 est de faible poids moléculaire et n'est probablement pas reprise dans le profil protéique analysé. Il est également possible que Cav1 soit présente sur les 2DGE mais que le spot correspondant soit masqué par le spot d'une autre protéine plus abondante sur ces 2DGE.

IV. Etude de l'abondance des protéines membranaires lors de la sénescence prématurée induite par H₂O₂

IV.1. Généralités

Afin de compléter ces données sur la néosynthèse des protéines cytosolubles suite au traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂ à concentration sublétales, nous avons choisi d'identifier des protéines membranaires ou associées aux membranes et dont l'abondance relative varie le 3^{ème} jour après ce traitement.

Bien que les protéines membranaires ne représentent que 1/3 des protéines encodées par le génome humain (Wallin and von Heijne, 1998), elles représentent plus de 2/3 des protéines cibles pour les médicaments (Hopkins and Groom, 2002). Pour cette raison, la caractérisation et l'identification de différences d'abondance des protéines membranaires, comme les protéines de la membrane plasmique, revêt un intérêt considérable.

Nous avons tenté de réaliser ici la première étude à large échelle de protéines microsomales dans le contexte de la sénescence prématurée.

La technique d'extraction de protéines membranaires et l'identification de ces protéines par l'utilisation de la spectrométrie de masse ne nous a permis d'identifier que très peu de protéines membranaires en tant que telles. Cependant, les changements d'abondance protéique observés 3 jours après le traitement avec H₂O₂ correspondent à des protéines qui sont décrites dans la littérature comme pouvant être associées à des protéines membranaires. Certaines des protéines qui présentent une variation de niveau d'abondance pourraient jouer un rôle dans l'établissement du phénotype de sénescence prématurée. Par exemple, la vimentine, un constituant des filaments intermédiaires, peut être associée à la membrane plasmique via sa liaison avec l'ankyrine (Georgatos and Marchesi, 1985; Georgatos et al., 1985). Chez les FDHs IMR-90 en sénescence prématurée, la vimentine a été identifiée dans plusieurs spots et présente des augmentations ou des diminutions d'abondance en fonction du spot étudié. Chez des individus âgés, une accumulation de vimentine modifiée dans les FDHs a été observée (Kueper et al., 2007). La cathepsine D (augmentation de 1,8 x en sénescence prématurée) est une protéase acide dont le précurseur a été observé associé en membrane de vésicules coatées et destinées à être transférées vers les lysosomes ou les endosomes (Diment et al., 1988; Ntais et al., 2004). La ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène K (hnRNP-K) (diminution de 1,7 x en sénescence prématurée) lie les pré-ARNm et joue un rôle dans le métabolisme des pré-ARNm

essentiellement riches en cystéine. Une étude protéomique récente a identifié des protéines partenaires de hnRNP-K comme Grb2, une protéine adaptatrice située proche de la membrane plasmique (Mikula et al., 2006).

D'autres approches techniques sont décrites dans la littérature afin d'analyser les protéines membranaires. Par exemple, la méthode du « blue native » en gel d'électrophorèse est utilisée pour la résolution sous forme native de protéines hydrophobes ou de complexes membranaires complexes. Les membranes sont resuspendues et résolues sous leur forme native selon une première dimension. Une seconde dimension par utilisation de la technique SDS-PAGE est ensuite utilisée afin de dénaturer, et donc de dissocier, les complexes et d'en résoudre les constituants séparément. Cette méthode a été développée afin d'étudier les protéines de membranes mitochondriales de cellules eucaryotes, et a ensuite été utilisée afin d'étudier les protéines de la membrane plasmique (Brookes et al., 2002; Kruff et al., 2001; Reisinger and Eichacker, 2006).

Dans d'autres études, l'utilisation de méthodes « gel-free » avec de la LC-MS/MS ont été utilisées afin de réaliser des études protéomiques membranaires. Par exemple, Wu et ses collaborateurs ont utilisé une approche basée sur la spectrométrie de masse afin d'identifier et de caractériser des protéines membranaires sur une grande échelle (Wu et al., 2006). Ils ont adapté la stratégie à l'analyse directe de mélanges de peptides complexes dérivées de digestion protéolytique de mélanges hétérogènes de protéines afin de générer rapidement un profil global des protéines présentes dans le mélange. La capacité d'analyser les protéines sous leur forme native, plutôt que dans un détergent ou dans un environnement de solvants organiques, permet l'analyse de la topologie protéique (Rabilloud, 2003).

Nous avons choisi de marquer les protéines issues des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée et des FDHs IMR-90 contrôles avec des cyanines fluorescentes avant leur séparation sur 2DGE, comme expliqué dans le matériel supplémentaire de l'article (Chrétien et al., 2008a). Comme déjà décrit avant, la technique 2D-DIGE présente de nombreux avantages. La migration des deux types d'échantillons est réalisée sur un seul gel, de même qu'un standard interne marqué, lui aussi, avec des cyanines. Le standard interne et la migration des échantillons sur un même gel permettent d'éliminer les variations de gel à gel. Le marquage protéique aux cyanines permet de visualiser à la fois des protéines très faiblement abondantes et fortement exprimées. Les programmes d'analyse automatisés permettent de déterminer très rapidement des variations d'abondance statistiquement significatives.

Les protéines identifiées lors des deux études protéomiques menées au cours de ce travail

sont propres à chaque étude. Cette constatation est logique puisque la première étude porte sur la néosynthèse de protéines entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement des cellules avec H₂O₂ alors que la seconde étude porte sur l'abondance de protéines membranaires à 3 jours après ce traitement. Ces deux études sont donc complémentaires et mettent en évidence la complexité du protéome cellulaire et donc de l'importance de son étude détaillée.

Il eut été possible d'identifier Rac1, Cdc42 et/ou Cav1 en tant que protéine associée à la membrane et présentant une variation d'abondance entre les cellules contrôles et traitées avec H₂O₂. En effet, bien que nous sachions à présent que l'abondance totale de Rac1 et Cdc42 ne varie pas dans nos conditions, leur activation nécessite la relocalisation vers la membrane plasmique. Cav1 présente une localisation essentiellement membranaire, puisqu'il s'agit du principal constituant des cavéoles. Cependant, bien que son abondance protéique augmente dans les jours qui suivent le traitement des FDHs avec H₂O₂, Cav1 n'a pas été identifiée parmi les protéines d'intérêts issues de l'analyse protéique réalisée à partir d'extraits membranaires de ces mêmes cellules. Pourtant, nous pourrions envisager que phospho-Cav1 soit présente au sein des cavéoles des FDHs IMR-90 à ce moment puisque il a déjà été montré que cette phosphorylation a lieu pour cette localisation subcellulaire (del Pozo et al., 2005). Une étude protéomique par utilisation de 2DGE présente cependant certaines limites. En effet, comme nous l'avons déjà expliqué pour le cas de Cav1, en fonction de leur propriété physico-chimique, toutes les protéines déposées sur le gel de première dimension ne pénètrent pas dans celui-ci. De plus, ces protéines sont de faible poids moléculaire et ne sont probablement pas reprises dans le profil protéique analysé. Il est également possible que ces protéines soient masquées par le spot d'une autre protéine plus abondante sur les 2DGE ou encore que ces protéines soient trop faiblement abondantes que pour être visualisées sur les 2DGE.

Quelques protéines ont été identifiées à partir de plusieurs spots sur les gels bidimensionnels. Ces spots pourraient correspondre à différentes isoformes de ces protéines présentant des modifications post-traductionnelles comme une phosphorylation ou une glycosylation. Il serait intéressant de caractériser ces modifications post-traductionnelles afin de mieux comprendre les implications fonctionnelles des changements observés par gels à 2 dimensions.

IV.2. Annexine A2

Parmi les protéines d'intérêt que nous avons identifiées, ANXA2 correspondait à plusieurs spots détectés sur les 2DGE. De plus, suite à notre étude protéomique, nous avons montré

clairement une induction et une relocalisation de ANXA2 vers la membrane après le traitement de FDHs IMR-90 avec H_2O_2 .

La présence de différentes isoformes de ANXA2 pourrait expliquer les différents spots mis en évidence sur nos gels bidimensionnels. Nous pourrions déterminer quelles sont ces isoformes ainsi que leur localisation subcellulaire chez les FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 .

Les protéines associées avec ANXA2 affectent également la localisation spécifique de cette protéine dans différents sites subcellulaires (Gerke and Moss, 2002).

En utilisant la technique des siRNA, nous pourrions éclaircir le rôle de ANXA2 dans notre modèle expérimental. Ceci nous permettrait de plus de déterminer si l'induction de cette protéine suite au stress avec H_2O_2 est une cause ou une conséquence de la sénescence prématurée.

Diverses études menées sur d'autres modèles cellulaires nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses quant au rôle de ANXA2 dans notre modèle.

Il a été démontré que ANXA2 est physiquement associée avec l'eitrine, la moesine, l' α -actinine et l'actine dans un complexe associé aux membranes. Ceci supporte l'hypothèse que ANXA2 fait partie de l'interface entre les membranes riches en cholestérol comme les endosomes ou la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine et suggère que ANXA2 fait partie d'un système moléculaire qui ancre le cytosquelette d'actine aux membranes cellulaires (Harder et al., 1997). Nous pourrions étudier une interaction potentielle entre l'eitrine et ANXA2 par co-immunoprécipitation à partir d'extraits membranaires de FDHs IMR-90 traités avec H_2O_2 . Ceci nous permettrait d'approfondir les mécanismes moléculaires impliqués dans la morphologie des FDHs en sénescence prématurée.

ANXA2 peut organiser les domaines membranaires et des plates-formes de recrutement pour les protéines en interagissant avec celles-ci (Gerke et al., 2005). Bien qu'aucun lien n'ait été démontré entre Cdc42, Rac1 et ANXA2 chez des FDHs, ces protéines GTPases interagissent avec ANXA2 dans des cellules épithéliales. Dans ces cellules, Rac1 est complexé à ANXA2 au niveau des contacts cellule-cellule afin d'orienter la membrane plasmique et la dynamique de l'actine lors du mécanisme d'adhérence médié par les cadhérines. Leur localisation en membrane plasmique semble être dépendante de la voie PI3K (Hansen et al., 2002). Cdc42 est recrutée par ANXA2 au niveau de la surface apicale afin de contrôler la membrane plasmique apicale dans le cadre du développement des tissus épithéliaux (Martin-Belmonte et al., 2007).

Puisque l'abondance protéique de ANXA2 et l'activité de Rac1 augmente à 3 jours après le traitement avec H_2O_2 , et puisque ces deux protéines sont situées en membrane dans ces conditions, nous pourrions déterminer si ces deux protéines interagissent et le rôle de cette

interaction potentielle. Nous avons déjà testé cette hypothèse en réalisant une co-immunoprécipitation à partir d'extraits totaux de FDHs IMR-90 contrôles ou traités, sans obtenir de différence entre ces deux conditions. Cette expérience pourrait être reproduite à partir d'extraits membranaires.

Enfin, il a déjà été montré que Cav1 peut former un complexe protéine chaperonne-lipide et faciliter le transport direct de molécules de cholestérol nouvellement synthétisée du réticulum endoplasmique vers les cavéoles, mais également des cavéoles aux membranes intracellulaires. Au cours de ce transport, le cholestérol est associé à Cav1 dans un complexe protéique comprenant entre autres ANXA2. ANXA2 ne présentant aucun motif classique de liaison à Cav1, le site d'interaction est inconnu. Il est proposé que ANXA2 n'interagit pas directement avec Cav1 mais via une liaison avec un cholestéryl ester (Uittenbogaard et al., 2002). Cette interaction a été observée pour des cellules en culture ainsi que lors de l'étude de la régulation du métabolisme intestinal des stérols (Shu et al., 2000; Smart et al., 2004; Uittenbogaard et al., 2002).

Une des perspectives de cette deuxième partie du travail est d'étudier le rôle des autres protéines identifiées. Par exemple la vimentine, qui a été identifiée comme étant présente dans les podosomes (Correia et al., 1999). Cette protéine liant l'actine pourrait également faire partie des mécanismes impliqués dans l'apparition de la morphologie sénescence.

V. Potentiel migratoire des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée et implication potentielle de Cdc42, Rac1, p38^{MAPK}, l'ezrine, L-CaD et ANXA2

La migration cellulaire directionnelle et l'adhérence des cellules à la matrice sont essentielles lors du développement embryonnaire, de la cicatrisation, de la prolifération cellulaire, de l'angiogenèse, ou de la progression des métastases et requièrent une polarisation cellulaire en combinaison avec un stimulus de motilité (Kheradmand et al., 1998; Kole et al., 2005). Ce processus est contrôlé par les voies de signalisation induites suite au contact de la cellule avec la matrice extracellulaire, mais aussi par l'exposition des cellules à des molécules solubles, des facteurs de prolifération ou des lipides. La stimulation des récepteurs transmembranaires initie les signaux intracellulaires à travers l'activation de nombreuses protéines comme les GTPases, les MAPK, des protéines régulées par le Ca⁺⁺, ou encore les PKC (Ridley, 2001).

La migration cellulaire peut être modélisée comme un processus répétitif, en plusieurs étapes. Cela commence par l'établissement de la polarité spatiale et l'extension de protrusions membranaires en direction du mouvement. Les nouvelles protrusions formées sont stabilisées par

adhérence ferme au substrat et elles initient le mécanisme de contraction qui génère l'avancée vers l'avant et la rétraction de l'arrière de la cellule.

Les capacités migratoires d'une cellule dépendent donc de la dynamique des microtubules et du cytosquelette d'actine. Alors que les microtubules jouent un rôle dans la polarité cellulaire, les mouvements cellulaires résultent de la polymérisation de l'actine du côté de la cellule correspondant au sens de la migration et de la contraction du côté opposé grâce à l'actomysosine. En parallèle, les microtubules et l'actine orchestrent également l'adhérence cellulaire au substrat. Rac1, Cdc42 et RhoA participent à ce processus grâce à la stabilisation du cytosquelette d'actine (ten Klooster et al., 2006).

De plus, selon la littérature, par leur rôle dans l'activation des JNK, Rac1 et Cdc42 permettent au facteur de transcription c-jun d'induire la transcription de gènes correspondant à des MMP qui permettront de dégrader la matrice après avoir été sécrétées (Ridley, 2001), ce qui pourrait favoriser la migration cellulaire au sein d'un tissu. Il a été montré par d'autres chercheurs que des FDHs de peau de derme en sénescence prématurée présentent une abondance augmentée des transcrits des MMP1, 2, 3, 7, 10 et 14 à long terme après le traitement (Borlon et al., 2007; Debacq-Chainiaux et al., 2005). Si les protéines MMP correspondantes à ces transcrits sont effectivement sécrétées en plus grande quantité par les FDHs de peau de derme en sénescence prématurée, cela permettrait à ces cellules d'augmenter le taux de dégradation de la matrice extra-cellulaire environnantes et donc de migrer plus facilement. Il est connu que Rho, Rac1 et Cdc42 affectent la stabilisation de ces microtubules afin de permettre la formation de longs lamellipodes (Ridley, 2001). Les RhoGTPases régulent donc de façon coordonnée les aspects multiples de la migration cellulaire, en affectant les différents composants du cytosquelette ainsi que l'adhérence au substrat et le remodelage de la matrice extracellulaire (Ridley, 2001). En 2005, il a été démontré que p38^{MAPK} activée est responsable de la migration de cellules endothéliales, associée avec une altération de l'architecture de l'actine et de la formation de lamellipodes. Par contre, cette protéine présente un effet opposé quant à leur prolifération (McMullen et al., 2005).

Pour revenir au potentiel migratoire des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée, nous avons montré que p38^{MAPK} et Rac1 contribuent à ce processus. Contrairement à cela, Cdc42 semble plutôt s'opposer à la migration des FDHs IMR-90 en sénescence prématurée.

Nous pouvons proposer l'hypothèse suivante. Puisque cet effet sur la migration des cellules a lieu plusieurs jours après traitement avec H₂O₂, nous pouvons imaginer que la phosphorylation

de $p38\alpha^{MAPK}$ et l'activation de Rac1 soient nécessaires à cette augmentation de la capacité de la migration des cellules en sénescence prématurée. Puisque l'activation de Cdc42 est moins importante dans les temps plus longs, nous pouvons imaginer que Cdc42 permet de moduler ce potentiel migratoire mais de façon modérée. Cette régulation négative par Cdc42 pourrait passer par l'inhibition des MMPs. En effet, il a déjà été montré précédemment que Cdc42 bloque l'expression de MMP1 en inhibant la voie des ERK dans des fibroblastes humains de peau (Deroanne et al., 2005).

Puisque le potentiel migratoire des cellules en sénescence prématurée semble pouvoir être régulé entre autres par Cdc42, Rac1 et $p38\alpha^{MAPK}$, il serait intéressant de déterminer le rôle du TGF- β 1 dans ce processus, notamment en utilisant des anticorps neutralisant le TGF- β 1. En effet, selon d'autres études, le TGF- β 1 semble être impliqué dans la migration de différents types cellulaires tels que des cellules leucémiques basophiles de rat (Edlund et al., 2002).

Ces résultats concernant le potentiel migratoire des FDHs IMR-90, bien que préliminaires, permettent aussi de proposer des hypothèses et des perspectives pour des protéines identifiées lors des études protéomiques comme l'eitrine, L-CaD ou ANXA2.

Il a précédemment été montré que l'altération de l'expression ou une inactivation de l'eitrine altère la morphologie cellulaire, la motilité, l'adhérence ou l'invasion cellulaire (Coscoy et al., 2002; Hunter, 2004). *In vivo*, la dégradation de l'eitrine par la calpaïne conduit à la dislocation du cytosquelette d'actine (Louvet-Vallee, 2000). Par contre, d'autres chercheurs ont montré qu'une surexpression de l'eitrine dans des cellules épithéliales augmente la capacité migratoire cellulaire et la tubulogenèse induite par une stimulation avec du HGF (« Hepatocyte Growth Factor ») (Crepaldi et al., 1997). Toujours selon la littérature, des fibroblastes immortalisés et surexprimant l'eitrine perdent complètement leur inhibition de contact, indiquant que cette protéine est impliquée dans l'adhérence cellule-cellule et cellule-substrat (Louvet-Vallee, 2000).

Les données de la littérature suggèrent que L-CaD joue un rôle sur l'organisation du cytosquelette en interagissant avec de nombreux partenaires protéiques. Ces interactions dictent la localisation de L-CaD dans les podosomes et les lamellipodes, induisent la formation de ces derniers et leurs fonctions dans la motilité et l'invasion cellulaire (Gu et al., 2007).

Dans le modèle de sénescence prématurée de FDHs humains, ANXA2 associée à la membrane plasmique permettrait peut-être la fluidité membranaire nécessaire à la formation de protrusions au cours du processus de migration. D'autres études montrent que ANXA2 induirait plutôt un blocage de la migration cellulaire alors que d'autres présentent un effet opposé (Balch

and Dedman, 1997; Hayes et al., 2004; Singh, 2007). En utilisant deux tests de migration indépendants, il a été montré par d'autres chercheurs que ANXA2 et A5 inhibent la motilité cellulaire de cellules de carcinomes de poumons. De plus, des anticorps anti-annexine augmentent la migration cellulaire (Balch and Dedman, 1997). D'une manière similaire à PI3K et à p38^{MAPK}, ANXA2 pourrait également permettre la migration et l'invasion cellulaire, par exemple, par l'interaction de cette protéine avec les extrémités protrusives de ces cellules (Singh, 2007). Selon la littérature, l'utilisation de siRNA anti-ANXA2 résulte en l'inhibition des propriétés invasives de cellules de gliomes et l'augmentation de fibres de stress. Ces récentes études suggèrent donc que l'interaction de ANXA2 avec le cytosquelette joue un rôle important dans l'invasion par les cellules cancéreuses (Singh, 2007).

Enfin, puisque le rôle de l'eitrine, L-CaD et ANXA2 est actuellement inconnu en ce qui concerne l'établissement de la sénescence prématurée induite par H₂O₂, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'invalidation de l'eitrine, L-CaD ou de l'ANXA2 sur la morphologie et le potentiel prolifératoire des FDHs IMR-90 après traitement avec H₂O₂.

VI. Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons donc étudié les effets à court (entre 1 h et 8 h) et à long terme (entre 1 jour et 4 jours) du traitement de FDHs IMR-90 avec H₂O₂ et avons partiellement complété les données de la littérature concernant les voies de signalisation activées suite à ce traitement. Grâce aux données récoltées au cours de ce travail, nous proposons, à titre hypothétique, le modèle présenté à la figure 63. Durant le traitement des FDHs IMR-90 avec H₂O₂, des voies de signalisation sont activées et impliquent Cdc42/p38^{MAPK}/HSP27, L-CaD et Cav1. Durant ce traitement, Rac1 est quant à elle inactive. Nous proposons donc que les réponses à court terme représentent essentiellement des voies de signalisation permettant à la cellule de mettre en place des systèmes de défense/réparation face au traitement avec H₂O₂. Un jour après ce traitement, les transcrits de TGF-β1 augmentent sous la dépendance de Cdc42 et p38^{MAPK}, ce qui permet l'apparition de certains marqueurs de la sénescence à plus long terme. Rac1 est également activée à ce moment. A plus long terme (entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour après le traitement), l'eitrine, L-CaD et HSP27 sont néosynthétisées. Ces mécanismes pourraient être responsables de l'apparition de la morphologie sénescence. Trois jours après le traitement, HSP27 est observée dans le cytosol mais également dans les noyaux et en région péri-nucléaire au sein des FDHs IMR-90. Une localisation nucléaire est également observée pour Cav1 dans les cellules en sénescence prématurée et permettrait à cette protéine de jouer un rôle dans l'induction ou la répression de la transcription de certains gènes cibles. ANXA2, quant à elle, est relocalisée

vers la membrane plasmique et pourrait également jouer un rôle dans l'apparition de la morphologie étalée des cellules.

Différentes études ont posé la question de savoir si la durée de vie proliférative *in vitro* de cellules en culture est une propriété cellulaire inhérente ou plutôt un artéfact de l'environnement de culture (Wright and Shay, 2001). Il a été suggéré que la sénescence répllicative et la durée de vie de cellules diploïdes en culture pourraient être liées à des conditions de prolifération inadéquates. La durée de vie proliférative est inversement proportionnelle à l'oxygène ambiant et directement reliée à la densité de cellulaire après repiquage. La concentration atmosphérique en oxygène (21 %) présente lors de la culture cellulaire est plus élevée que dans la plupart des tissus et est une source de stress pour ces cellules (Pour une revue : (Serrano and Blasco, 2001)). Cette concentration en oxygène est donc également une source de variabilité accrue de comportement cellulaire en fonction de la capacité de résistance individuelle de chaque cellule d'une culture.

Il a donc été proposé qu'il est possible de déterminer des conditions de culture, dont une pression partielle en oxygène physiologique réduite, minimisant les stress de la culture (Ramirez et al., 2001; Wright and Shay, 2001). Lorsque la pression partielle en oxygène *in vitro* est de 3% plutôt que de 20%, le nombre de divisions cellulaires augmente. Cependant, à une concentration physiologique en O₂, le nombre de divisions cellulaires en culture possible devient beaucoup plus élevé qu'*in vivo*, en ce qui concerne les FDHs (voir discussion de l'article 1).

Il est donc important d'étudier des modèles représentatifs de ce qui pourrait se produire *in vivo*, où des stress de forte nature existent, parfois très localement. Au laboratoire, des modèles de sénescence prématurée ont été développés et ont été comparés au modèle de sénescence répllicative. Il a été montré que le modèle de sénescence prématurée induite par un ou plusieurs stress n'est pas semblable au modèle de sénescence répllicative (Dierick et al., 2002a; Pascal et al., 2005). Cependant, *in vivo*, les tissus sont continuellement exposés à divers agents stressants. Ainsi, les cellules en sénescence prématurée induite par des stress (oxydatifs) pourraient jouer un rôle au niveau des changements liés à l'âge des individus ou lors de maladie liées à l'âge.

Bien qu'il s'agisse d'un sujet longtemps controversé, un nombre croissant de données démontrent que le processus de sénescence prématurée pourrait également se produire *in vivo* (Pour une revue : (Bird et al., 2003)) (voir discussion de l'article 1).

Les cellules présentant des caractéristiques de la sénescence s'accumulent avec l'âge dans de multiples tissus humains ou de rongeurs. Des cellules sénescents sont présentes en des sites de certaines pathologies liées à l'âge comme des lésions athérosclérotiques, des ulcères de la peau, des zones d'arthrose, etc. (Pour une revue : (Campisi, 2005)) ; (Fenton et al., 2001; Krabbe

et al., 2004; Minamino and Komuro, 2006; Minamino and Komuro, 2007; Minamino et al., 2002). Des fibroblastes en culture issus d'ulcère veineux ou de peau intacte sujette à une hypertension veineuse présentent des caractéristiques de la sénescence (Mendez et al., 1998). De même, le vieillissement prématuré de FDHs de poumon a été observé *in vitro* lorsque les cellules provenaient de patients présentant des problèmes d'emphysème. Les fibroblastes jouent un rôle important dans la maintenance des structures alvéolaires. Un phénotype sénescence pourrait donc affecter les tissus, la maintenance structurelle des poumons et donc être impliqué dans la pathobiologie de l'emphysème (Muller et al., 2006). Ce mécanisme de vieillissement prématuré de fibroblastes de patients emphysemateux est indépendant du raccourcissement télomérique, bien que les cellules présentent une capacité de prolifération réduite, une altération de la réponse aux facteurs de prolifération et un faible nombre de doublement de population en culture.

Ainsi, les cellules sénescence peuvent contribuer au vieillissement et aux pathologies liées à l'âge en stimulant le remodelage des tissus et les inflammations locales qui peuvent compromettre la structure et la fonction des tissus (Pour une revue : (Campisi, 2005)).

La réponse immunitaire innée semble être activée au cours du vieillissement, conduisant à un état pro-inflammatoire. La perturbation de l'équilibre entre l'immunité innée et adaptative associée à l'âge conduit à un phénotype pro-inflammatoire appelé « inflamm-aging » (Franceschi et al., 2000). Chez une personne âgée, un stress antigénique ou oxydatif va augmenter la demande envers le système immunitaire inné et conduire à un état caractérisé par une réponse inflammatoire de faible niveau (« low grade inflammation ») mais chronique. Cela peut induire ou aggraver les maladies dégénératives associées à l'âge telles que l'athérosclérose ou les maladies neurodégénératives.

La sénescence cellulaire a été définie comme étant un mécanisme anti-cancer ou un mécanisme suppresseur de tumeur. Dans ce cas, la réponse sénescence serait bénéfique puisqu'elle protège notre organisme du cancer. Des mécanismes protecteurs de tumeurs, comme le raccourcissement des télomères et l'activation de p16^{INK-4}, limitent le potentiel de prolifération de cellules et ont un effet pro-vieillescence (Pour une revue : (Serrano and Blasco, 2007) ; (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)). En plus des mécanismes divergents, des mécanismes convergents qui empêchent la prolifération excessive, sont observés dans les processus de vieillissement et de cancer. L'équilibre entre ces mécanismes assure une vie saine pour la majorité des individus durant leur vie d'enfant et d'adulte (Pour une revue : (Serrano and Blasco, 2007)). En 2001, il a été montré que des FDHs IMR-90 en sénescence répliquative ou induite par H₂O₂ stimulent les cellules épithéliales pré-malignes et malignes, mais pas les cellules normales, à proliférer en culture et à former des tumeurs chez la souris. Ceci semble lié à des facteurs

solubles et insolubles sécrétés par les cellules sénescents. Les fibroblastes sénescents sécrètent des facteurs de prolifération, des cytokines, de la matrice extra-cellulaire et des enzymes de dégradation. Ces facteurs peuvent altérer le microenvironnement tissulaire et donc affecter les cellules épithéliales environnantes (Krtolica et al., 2001). Cependant, actuellement peu de données sont disponibles concernant le sécrétome des cellules en sénescence prématurée. Il serait donc intéressant de réaliser ce type d'étude afin de déterminer quelles protéines présentent des variations d'abondance extracellulaire ainsi que d'étudier les mécanismes responsables de ce processus. Si la proportion des cellules sénescents augmente avec l'âge de l'individu, ces cellules pourraient contribuer à modifier progressivement les tissus en plus d'éventuellement promouvoir la prolifération des cellules voisines. L'incidence des cancers augmente exponentiellement avec l'âge des humains et d'autres espèces de mammifères (Pour une revue : (Krtolica and Campisi, 2002)). Ceci suggère donc que bien que la sénescence cellulaire supprime la tumorigenèse chez les organismes jeunes, ce mécanisme peut promouvoir le cancer chez les organismes âgés, suggérant qu'il s'agit d'un exemple d'effet d'antagonisme pléiotropique de l'évolution (Krtolica et al., 2001).

BIBLIOGRAPHIE

- Albrecht, J. H., Poon, R. Y., Ahonen, C. L., Rieland, B. M., Deng, C. and Crary, G. S.** (1998). Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* **16**, 2141-50.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J. C.** (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13742-7.
- Ali, S., Jain, S. K., Abdulla, M. and Athar, M.** (1996). Paraquat induced DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem Mol Biol Int* **39**, 63-7.
- Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B.** (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* **116**, 217-24.
- Antczak, A., Nowak, D., Shariati, B., Krol, M., Piasecka, G. and Kurmanowska, Z.** (1997). Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* **10**, 1235-41.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P.** (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-9.
- Arrigo, A. P., Firdaus, W. J., Mellier, G., Moulin, M., Paul, C., Diaz-latoud, C. and Kretz-remy, C.** (2005). Cytotoxic effects induced by oxidative stress in cultured mammalian cells and protection provided by Hsp27 expression. *Methods* **35**, 126-38.
- Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C. and Riabowol, K.** (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8348-52.
- Atfi, A., Djelloul, S., Chastre, E., Davis, R. and Gespach, C.** (1997). Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* **272**, 1429-32.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Burkhard, F. C., Wray, S. and Draeger, A.** (2002). Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *Faseb J* **16**, 1177-84.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J. and Cerione, R. A.** (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 27995-8.
- Bai, X., Chen, X., Hou, K., Zhang, P., Feng, Z. and Fu, B.** (2007). Effect of cell cycle inhibitor p19ARF on senescence of human diploid cell. *Sci China C Life Sci* **50**, 155-60.
- Baird, D., Feng, Q. and Cerione, R. A.** (2005). The Cool-2/alpha-Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol* **15**, 1-10.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. and Arteaga, C. L.** (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **275**, 36803-10.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T.** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-95.
- Balch, C. and Dedman, J. R.** (1997). Annexins II and V inhibit cell migration. *Exp Cell Res* **237**, 259-63.
- Batandier, C., Fontaine, E., Keriél, C. and Leverve, X. M.** (2002). Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med* **6**, 175-87.
- Batchelor, C. L., Higginson, J. R., Chen, Y. J., Vanni, C., Eva, A. and Winder, S. J.** (2007). Recruitment of Dbl by ezrin and dystroglycan drives membrane proximal Cdc42 activation and filopodia formation. *Cell Cycle* **6**, 353-63.
- Bayreuther, K., Rodemann, H. P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P. I.** (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5112-6.

- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J.** (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* **22**, 4212-22.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N.** (1998a). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-81.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N.** (1998b). Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 118-27.
- Benvenuti, S., Cramer, R., Bruce, J., Waterfield, M. D. and Jat, P. S.** (2002a). Identification of novel candidates for replicative senescence by functional proteomics. *Oncogene* **21**, 4403-13.
- Benvenuti, S., Cramer, R., Quinn, C. C., Bruce, J., Zvelebil, M., Corless, S., Bond, J., Yang, A., Hockfield, S., Burlingame, A. L. et al.** (2002b). Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Proteomics* **1**, 280-92.
- Berardi, P., Meyyappan, M. and Riabowol, K. T.** (2003). A novel transcriptional inhibitory element differentially regulates the cyclin D1 gene in senescent cells. *J Biol Chem* **278**, 7510-9.
- Bierman, E. L.** (1978). The effect of donor age on the in vitro life span of cultured human arterial smooth-muscle cells. *In Vitro* **14**, 951-5.
- Bird, J., Ostler, E. L. and Faragher, R. G.** (2003). Can we say that senescent cells cause ageing? *Exp Gerontol* **38**, 1319-26.
- Bishop, A. L. and Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E.** (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- Boraldi, F., Bini, L., Liberatori, S., Armini, A., Pallini, V., Tiozzo, R., Pasquali-Ronchetti, I. and Quaglini, D.** (2003). Proteome analysis of dermal fibroblasts cultured in vitro from human healthy subjects of different ages. *Proteomics* **3**, 917-29.
- Borbiev, T., Birukova, A., Liu, F., Nurmukhambetova, S., Gerthoffer, W. T., Garcia, J. G. and Verin, A. D.** (2004). p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**, L911-8.
- Borlon, C., Debacq-Chainiaux, F., Hinrichs, C., Scharffetter-Kochanek, K., Toussaint, O. and Wlaschek, M.** (2007). The gene expression profile of psoralen plus UVA-induced premature senescence in skin fibroblasts resembles a combined DNA-damage and stress-induced cellular senescence response phenotype. *Exp Gerontol* **42**, 911-23.
- Borrelli, M. J., Bernock, L. J., Landry, J., Spitz, D. R., Weber, L. A., Hickey, E., Freeman, M. L. and Corry, P. M.** (2002). Stress protection by a fluorescent Hsp27 chimera that is independent of nuclear translocation or multimeric dissociation. *Cell Stress Chaperones* **7**, 281-96.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M.** (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **186**, 343-55.
- Boxman, I. L., Kempenaar, J., de Haas, E. and Poncet, M.** (2002). Induction of HSP27 nuclear immunoreactivity during stress is modulated by vitamin C. *Exp Dermatol* **11**, 509-17.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H. and Toussaint, O.** (2000). EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J* **19**, 1929-34.
- Brookes, P. S., Pinner, A., Ramachandran, A., Coward, L., Barnes, S., Kim, H. and Darley-Usmar, V. M.** (2002). High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics* **2**, 969-77.

- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G. J.** (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**, 552-7.
- Bryantsev, A. L., Chechenova, M. B. and Shelden, E. A.** (2007). Recruitment of phosphorylated small heat shock protein Hsp27 to nuclear speckles without stress. *Exp Cell Res* **313**, 195-209.
- Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E. and Fornace, A. J., Jr.** (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* **18**, 6845-54.
- Campisi, J.** (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* **84**, 497-500.
- Campisi, J.** (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-22.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F.** (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-40.
- Caplan, J. F., Filipenko, N. R., Fitzpatrick, S. L. and Waisman, D. M.** (2004). Regulation of annexin A2 by reversible glutathionylation. *J Biol Chem* **279**, 7740-50.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2002). UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1331-9.
- Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M. and Nevins, J. R.** (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**, 1053-61.
- Chen, G., Hitomi, M., Han, J. and Stacey, D. W.** (2000a). The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem* **275**, 38973-80.
- Chen, I. T., Smith, M. L., O'Connor, P. M. and Fornace, A. J., Jr.** (1995). Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21Waf1/Cip1 with PCNA. *Oncogene* **11**, 1931-7.
- Chen, J. H., Ozanne, S. E. and Hales, C. N.** (2007). Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. *Methods Mol Biol* **371**, 179-89.
- Chen, Q. and Ames, B. N.** (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4130-4.
- Chen, Q. M., Bartholomew, J. C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D. and Ames, B. N.** (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* **332** (Pt 1), 43-50.
- Chen, Q. M., Liu, J. and Merrett, J. B.** (2000b). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J* **347**, 543-51.
- Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S. and Linskens, M. H.** (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* **265**, 294-303.
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T.** (2000c). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* **113** (Pt 22), 4087-97.
- Chen, Q. M., Tu, V. C. and Liu, J.** (2000d). Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb. *Biogerontology* **1**, 335-9.
- Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H. P., Kim, K. T., Jang, I. S. and Park, S. C.** (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem* **279**, 42270-8.

- Cho, K. A., Ryu, S. J., Park, J. S., Jang, I. S., Ahn, J. S., Kim, K. T. and Park, S. C.** (2003). Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* **278**, 27789-95.
- Chrétien, A., Delaive, E., Dieu, M., Demazy, C., Ninane, N., Raes, M. and Toussaint, O.** (2008a). Upregulation of annexin A2 in H₂O₂-induced premature senescence as evidenced by 2D-DIGE proteome analysis. *Exp Gerontol* **43**, 353-9.
- Chrétien, A., Dierick, J. F., Delaive, E., Larsen, M. R., Dieu, M., Raes, M., Deroanne, C. F., Roepstorff, P. and Toussaint, O.** (2008b). Role of TGF-beta1-independent changes in protein neosynthesis, p38alpha(MAPK), and cdc42 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis. *Free Radic Biol Med*, in press.
- Ciocca, D. R. and Calderwood, S. K.** (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **10**, 86-103.
- Cong, Y. S., Fan, E. and Wang, E.** (2006). Simultaneous proteomic profiling of four different growth states of human fibroblasts, using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry. *Mech Ageing Dev* **127**, 332-43.
- Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C. and Piccolo, S.** (2003). Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* **113**, 301-14.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y. H., Goldman, R. D. and Matsudaira, P.** (1999). Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol* **146**, 831-42.
- Coscoy, S., Waharte, F., Gautreau, A., Martin, M., Louvard, D., Mangeat, P., Arpin, M. and Amblard, F.** (2002). Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12813-8.
- Crepaldi, T., Gautreau, A., Comoglio, P. M., Louvard, D. and Arpin, M.** (1997). Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol* **138**, 423-34.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. and Jackson, S. P.** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-8.
- D'Angelo, G., Graceffa, P., Wang, C. A., Wrangle, J. and Adam, L. P.** (1999). Mammal-specific, ERK-dependent, caldesmon phosphorylation in smooth muscle. Quantitation using novel anti-phosphopeptide antibodies. *J Biol Chem* **274**, 30115-21.
- Dasari, A., Bartholomew, J. N., Volonte, D. and Galbiati, F.** (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res* **66**, 10805-14.
- Davies, K. J.** (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* **50**, 279-89.
- de Graauw, M., Tijdens, I., Smeets, M. B., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M. and van de Water, B.** (2008). Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin Activation. *Mol Cell Biol* **28**, 1029-40.
- de Magalhaes, J. P., Chainiaux, F., de Longueville, F., Mainfroid, V., Migeot, V., Marcq, L., Remacle, J., Salmon, M. and Toussaint, O.** (2004). Gene expression and regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase. *Exp Gerontol* **39**, 1379-89.
- de Magalhaes, J. P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2002). Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett* **523**, 157-62.

- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguier, B., de Longueville, F., Boffe, S. et al.** (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* **118**, 743-58.
- del Pozo, M. A., Balasubramanian, N., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Grande-Garcia, A., Anderson, R. G. and Schwartz, M. A.** (2005). Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat Cell Biol* **7**, 901-8.
- Deng, Q., Liao, R., Wu, B. L. and Sun, P.** (2004). High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem* **279**, 1050-9.
- Deroanne, C. F., Hamelryckx, D., Ho, T. T., Lambert, C. A., Catroux, P., Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V.** (2005). Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway. *J Cell Sci* **118**, 1173-83.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Diebold, B. A., Fowler, B., Lu, J., Dinanuer, M. C. and Bokoch, G. M.** (2004). Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **279**, 28136-42.
- Dierick, J. F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S. J., Larsen, P. M. and Toussaint, O.** (2002a). Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol* **64**, 1011-7.
- Dierick, J. F., Kalume, D. E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O.** (2002b). Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* **531**, 499-504.
- Dierick, J. F., Wenders, F., Chainiaux, F., Remacle, J., Fisher, A. B. and Toussaint, O.** (2003). Retrovirally mediated overexpression of peroxiredoxin VI increases the survival of WI-38 human diploid fibroblasts exposed to cytotoxic doses of tert-butylhydroperoxide and UVB. *Biogerontology* **4**, 125-31.
- Diment, S., Leech, M. S. and Stahl, P. D.** (1988). Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* **263**, 6901-7.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al.** (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.
- Doetsch, P.** (2001). DNA Repair Disorders.: Encyclopedia of Life Sciences, Nature publishing group.
- Drané, P., Alvarez, S., Meiller, A. and May, E.** (2002). L'activation de la protéine p53, un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes. *Médecine nucléaire* **26**, 139-147.
- Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Reed, S. I.** (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-23.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Fripiat, C., Pascal, T., Dierick, J. F., Eliaers, F., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2000a). Human diploid fibroblasts display a decreased level of c-fos mRNA at 72 hours after exposure to sublethal H2O2 stress. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 306-9.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2000b). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* **28**, 361-73.

- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E. S. and Toussaint, O.** (2002). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones* **7**, 23-35.
- Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J. F., Chainiaux, F., Fripiat, C., de Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2001). Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* **502**, 109-12.
- Eaton, P., Fuller, W. and Shattock, M. J.** (2002). S-thiolation of HSP27 regulates its multimeric aggregate size independently of phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 21189-96.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H. and Aspenstrom, P.** (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* **13**, 902-14.
- Eppinga, R. D., Li, Y., Lin, J. L. and Lin, J. J.** (2006). Tropomyosin and caldesmon regulate cytokinesis speed and membrane stability during cell division. *Arch Biochem Biophys* **456**, 161-74.
- Erickson, S., Sangfelt, O., Heyman, M., Castro, J., Einhorn, S. and Grandeur, D.** (1998). Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene* **17**, 595-602.
- Erikson, E. and Erikson, R. L.** (1980). Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell* **21**, 829-36.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-35.
- Evans, C. H. and Georgescu, H. I.** (1983). Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech Ageing Dev* **22**, 179-91.
- Evans, M. C., Rich, A. M. and Nugent, J. H.** (2000). Evidence for the presence of a component of the Mn complex of the photosystem II reaction centre which is exposed to water in the S(2) state of the water oxidation complex. *FEBS Lett* **477**, 113-7.
- Evans, P. and Halliwell, B.** (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* **85 Suppl 2**, S67-74.
- Eves, R., Webb, B. A., Zhou, S. and Mak, A. S.** (2006). Caldesmon is an integral component of podosomes in smooth muscle cells. *J Cell Sci* **119**, 1691-702.
- Farnham, P. J., Slansky, J. E. and Kollmar, R.** (1993). The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta* **1155**, 125-31.
- Feng, Q., Albeck, J. G., Cerione, R. A. and Yang, W.** (2002). Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem* **277**, 5644-50.
- Feng, X. H. and Derynck, R.** (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-93.
- Feng, Y., Venema, V. J., Venema, R. C., Tsai, N. and Caldwell, R. B.** (1999). VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 192-7.
- Fenton, M., Barker, S., Kurz, D. J. and Erusalimsky, J. D.** (2001). Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 220-6.
- Ferreira, M. G., Miller, K. M. and Cooper, J. P.** (2004). Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* **13**, 7-18.
- Finkel, T.** (2006). Intracellular redox regulation by the family of small GTPases. *Antioxid Redox Signal* **8**, 1857-63.

- Finkel, T., Serrano, M. and Blasco, M. A.** (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature* **448**, 767-74.
- Fonager, J., Beedholm, R., Clark, B. F. and Rattan, S. I.** (2002). Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol* **37**, 1223-8.
- Forman, H. J.** (2007). Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **42**, 926-32.
- Foster, D. B., Huang, R., Hatch, V., Craig, R., Graceffa, P., Lehman, W. and Wang, C. L.** (2004). Modes of caldesmon binding to actin: sites of caldesmon contact and modulation of interactions by phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 53387-94.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E. and De Benedictis, G.** (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 244-54.
- Francz, P. I., Bayreuther, K. and Rodemann, H. P.** (1989). Cytoplasmic, nuclear, membrane-bound and secreted [35S]methionine-labelled polypeptide pattern in differentiating fibroblast stem cells in vitro. *J Cell Sci* **92** (Pt 2), 231-9.
- Fridovich, I.** (2001). Oxidative Stress: Encyclopedia of Life Sciences, Nature publishing group.
- Friguet, B.** (2003). Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique* **21**, 103-107.
- Friguet, B.** (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett* **580**, 2910-6.
- Frippiat, C., Chen, Q. M., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2000). Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol* **35**, 733-45.
- Frippiat, C., Chen, Q. M., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 2531-7.
- Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2002). Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **33**, 1334-46.
- Frippiat, C., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2003). Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in H₂O₂-induced premature senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 246-54.
- Fu, Y., Liu, H. W., Forsythe, S. M., Kogut, P., McConville, J. F., Halayko, A. J., Camoretti-Mercado, B. and Solway, J.** (2000). Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding. *J Appl Physiol* **89**, 1985-90.
- Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T. and Ide, T.** (1995). Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* **81**, 139-57.
- Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S. and Oikawa, S.** (2007). H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol Biochem* **20**, 45-54.
- Fuxe, J., Akusjarvi, G., Goike, H. M., Roos, G., Collins, V. P. and Pettersson, R. F.** (2000). Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ* **11**, 373-84.
- Gadea, G., Roger, L., Anguille, C., de Toledo, M., Gire, V. and Roux, P.** (2004). TNFalpha induces sequential activation of Cdc42- and p38/p53-dependent pathways that antagonistically regulate filopodia formation. *J Cell Sci* **117**, 6355-64.

- Gafken, P. R. and Lampe, P. D.** (2006). Methodologies for characterizing phosphoproteins by mass spectrometry. *Cell Commun Adhes* **13**, 249-62.
- Garcia, A. J., Vega, M. D. and Boettiger, D.** (1999). Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell* **10**, 785-98.
- Garcia, G. G., Sadighi Akha, A. A. and Miller, R. A.** (2007). Age-related defects in moesin/ezrin cytoskeletal signals in mouse CD4 T cells. *J Immunol* **179**, 6403-9.
- Garcia, J. G., Wang, P., Schaphorst, K. L., Becker, P. M., Borbiev, T., Liu, F., Birukova, A., Jacobs, K., Bogatcheva, N. and Verin, A. D.** (2002). Critical involvement of p38 MAP kinase in pertussis toxin-induced cytoskeletal reorganization and lung permeability. *Faseb J* **16**, 1064-76.
- Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L. and Maes, D.** (2001). Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* **117**, 1290-5.
- Gartel, A. L. and Radhakrishnan, S. K.** (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**, 3980-5.
- Georgatos, S. D. and Marchesi, V. T.** (1985). The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model system for the study of intermediate filament-membrane interactions. *J Cell Biol* **100**, 1955-61.
- Georgatos, S. D., Weaver, D. C. and Marchesi, V. T.** (1985). Site specificity in vimentin-membrane interactions: intermediate filament subunits associate with the plasma membrane via their head domains. *J Cell Biol* **100**, 1962-7.
- Gerke, V., Creutz, C. E. and Moss, S. E.** (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 449-61.
- Gerke, V. and Moss, S. E.** (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-71.
- Gerthoffer, W. T.** (2005). Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G849-53.
- Gilley, D., Tanaka, H. and Herbert, B. S.** (2005). Telomere dysfunction in aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1000-13.
- Glennay, J. R., Jr. and Tack, B. F.** (1985). Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7884-8.
- Gobeil, F., Jr., Bernier, S. G., Vazquez-Tello, A., Brault, S., Beauchamp, M. H., Quiniou, C., Marrache, A. M., Checchin, D., Sennlaub, F., Hou, X. et al.** (2003). Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1. *J Biol Chem* **278**, 38875-83.
- Goeptar, A. R., Scheerens, H. and Vermeulen, N. P.** (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* **25**, 25-65.
- Goncharova, E. A., Shirinsky, V. P., Shevelev, A. Y., Marston, S. B. and Vorotnikov, A. V.** (2001). Actomyosin cross-linking by caldesmon in non-muscle cells. *FEBS Lett* **497**, 113-7.
- Gonos, E. S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B. F., Jat, P. S. and Rattan, S. I.** (1998). Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res* **240**, 66-74.
- Graumann, J., Hubner, N. C., Kim, J. B., Ko, K., Moser, M., Kumar, C., Cox, J., Schoeler, H. and Mann, M.** (2007). SILAC-labeling and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5111 proteins. *Mol Cell Proteomics*.

- Graves, P. R. and Haystead, T. A.** (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63; table of contents.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K. and Davies, K. J.** (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2519-30.
- Grune, T., Reinheckel, T., North, J. A., Li, R., Bescos, P. B., Shringarpure, R. and Davies, K. J.** (2002). Ezrin turnover and cell shape changes catalyzed by proteasome in oxidatively stressed cells. *Faseb J* **16**, 1602-10.
- Gu, Z., Kordowska, J., Williams, G. L., Wang, C. L. and Hai, C. M.** (2007). Erk1/2 MAPK and caldesmon differentially regulate podosome dynamics in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res* **313**, 849-66.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. and Aebersold, R.** (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-9.
- Hai, C. M. and Gu, Z.** (2006). Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling. *Eur J Cell Biol* **85**, 305-9.
- Halliwell, B.** (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease: Encyclopedia of Life Sciences, Nature publishing group.
- Halliwell, B. and Chirico, S.** (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **57**, 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Han, X. L., Wu, F. G., Zhang, Z. Y. and Tong, T. J.** (2007). Posttranscriptional induction of p21Waf1 mediated by ectopic p16INK4 in human diploid fibroblast. *Chin Med J (Engl)* **120**, 405-9.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. and Nishida, E.** (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* **274**, 27161-7.
- Hannon, G. J. and Beach, D.** (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257-61.
- Hansen, M. D., Ehrlich, J. S. and Nelson, W. J.** (2002). Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem* **277**, 45371-6.
- Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G. and Gruenberg, J.** (1997). Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* **8**, 533-45.
- Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W.** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. et al.** (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**, 387-400.
- Harrington, E. A., Bruce, J. L., Harlow, E. and Dyson, N.** (1998). pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11945-50.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M.** (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-9.
- Hayashi, K., Yano, H., Hashida, T., Takeuchi, R., Takeda, O., Asada, K., Takahashi, E., Kato, I. and Sobue, K.** (1992). Genomic structure of the human caldesmon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12122-6.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R.** (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 51-88.

- Hayes, M. J., Merrifield, C. J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C. D., Levine, T. P., Proust, J., Curran, J., Bailly, M. and Moss, S. E.** (2004). Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* **279**, 14157-64.
- Hayflick, L. and Moorhead, P. S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Head, B. P. and Insel, P. A.** (2007). Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol* **17**, 51-7.
- Hedges, J. C., Oxborn, B. C., Carty, M., Adam, L. P., Yamboliev, I. A. and Gerthoffer, W. T.** (2000). Phosphorylation of caldesmon by ERK MAP kinases in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C718-26.
- Heidenreich, O., Neininger, A., Schratt, G., Zinck, R., Cahill, M. A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M. et al.** (1999). MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **274**, 14434-43.
- Helfman, D. M., Levy, E. T., Berthier, C., Shtutman, M., Riveline, D., Grosheva, I., Lachish-Zalait, A., Elbaum, M. and Bershadsky, A. D.** (1999). Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions. *Mol Biol Cell* **10**, 3097-112.
- Herlaar, E. and Brown, Z.** (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* **5**, 439-47.
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J.** (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* **15**, 2672-81.
- Ho, H. Y., Cheng, M. L. and Chiu, D. T.** (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep* **12**, 109-18.
- Hommelgaard, A. M., Roepstorff, K., Vilhardt, F., Torgersen, M. L., Sandvig, K. and van Deurs, B.** (2005). Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization. *Traffic* **6**, 720-4.
- Honda, S., Hjelmeland, L. M. and Handa, J. T.** (2002). Senescence associated beta galactosidase activity in human retinal pigment epithelial cells exposed to mild hyperoxia in vitro. *Br J Ophthalmol* **86**, 159-62.
- Hopkins, A. L. and Groom, C. R.** (2002). The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 727-30.
- Hornsby, P. J. and Gill, G. N.** (1978). Characterization of adult bovine adrenocortical cells throughout their life span in tissue culture. *Endocrinology* **102**, 926-36.
- Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y. and Dong, Z.** (1999). p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* **274**, 12229-35.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B. and Wilson, M. R.** (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* **274**, 6875-81.
- Hunter, K. W.** (2004). Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med* **10**, 201-4.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F. and Landry, J.** (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* **80**, 383-92.
- Ishikawa, R., Yamashiro, S., Kohama, K. and Matsumura, F.** (1998). Regulation of actin binding and actin bundling activities of fascin by caldesmon coupled with tropomyosin. *J Biol Chem* **273**, 26991-7.

- Isufi, I., Seetharam, M., Zhou, L., Sohal, D., Opalinska, J., Pahanish, P. and Verma, A.** (2007). Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *J Interferon Cytokine Res* **27**, 543-52.
- Iwasa, H., Han, J. and Ishikawa, F.** (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 131-44.
- Joliot, A., Trembleau, A., Raposo, G., Calvet, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A.** (1997). Association of Engrailed homeoproteins with vesicles presenting caveolae-like properties. *Development* **124**, 1865-75.
- Kaldis, P.** (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* **55**, 284-96.
- Karlseder, J., Smogorzewska, A. and de Lange, T.** (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**, 2446-9.
- Katakura, Y., Yamamoto, K., Miyake, O., Yasuda, T., Uehara, N., Nakata, E., Kawamoto, S. and Shirahata, S.** (1997). Bidirectional regulation of telomerase activity in a subline derived from human lung adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 313-7.
- Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M. and Werb, Z.** (1998). Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* **280**, 898-902.
- Kim, K. H., Park, G. T., Lim, Y. B., Rue, S. W., Jung, J. C., Sonn, J. K., Bae, Y. S., Park, J. W. and Lee, Y. S.** (2004). Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 819-25.
- Kitazono, A., Gerald, J., N., F. and Kron, S., J.** (2001). Cell cycle: regulation by cyclins: Encyclopedia of Life Sciences, Nature publishing group.
- Kole, T. P., Tseng, Y., Jiang, I., Katz, J. L. and Wirtz, D.** (2005). Intracellular mechanics of migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell* **16**, 328-38.
- Kordowska, J., Hetrick, T., Adam, L. P. and Wang, C. L.** (2006). Phosphorylated l-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading. *Exp Cell Res* **312**, 95-110.
- Krabbe, K. S., Pedersen, M. and Bruunsgaard, H.** (2004). Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* **39**, 687-99.
- Kregel, K. C. and Zhang, H. J.** (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R18-36.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M. R., Ligon, K. L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S. and Sharpless, N. E.** (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443**, 453-7.
- Krtolica, A. and Campisi, J.** (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1401-14.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. and Campisi, J.** (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12072-7.
- Kruff, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W. and Braun, H. P.** (2001). Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 1694-710.
- Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G. M., Gaemlich, A., Jung, T. et al.** (2007). Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J Biol Chem* **282**, 23427-36.
- Kulju, K. S. and Lehman, J. M.** (1995). Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res* **217**, 336-45.

- Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C. and Young, P. R.** (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 533-8.
- Kumazaki, T., Kobayashi, M. and Mitsui, Y.** (1993). Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res* **205**, 396-402.
- Kurata, S.** (2000). Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. *J Biol Chem* **275**, 23413-6.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. D.** (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3613-22.
- La Thangue, N. B.** (1994). DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 443-50.
- Lamond, A. I. and Spector, D. L.** (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 605-12.
- Lander, E. S.** (1999). Array of hope. *Nat Genet* **21**, 3-4.
- Lanza, I. R., Befroy, D. E. and Kent-Braun, J. A.** (2005). Age-related changes in ATP-producing pathways in human skeletal muscle in vivo. *J Appl Physiol* **99**, 1736-44.
- Laskey, R. A., Fairman, M. P. and Blow, J. J.** (1989). S phase of the cell cycle. *Science* **246**, 609-14.
- Lauvrak, S. U., Hollas, H., Doskeland, A. P., Aukrust, I., Flatmark, T. and Vedeler, A.** (2005). Ubiquitinated annexin A2 is enriched in the cytoskeleton fraction. *FEBS Lett* **579**, 203-6.
- Lee, C. M., Weindruch, R. and Aiken, J. M.** (1997). Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* **22**, 1259-69.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W. et al.** (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-46.
- Lee, S. H., Eom, M., Lee, S. J., Kim, S., Park, H. J. and Park, D.** (2001). BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem* **276**, 25066-72.
- Lees, E.** (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 773-80.
- Li, W. G., Miller, F. J., Jr., Zhang, H. J., Spitz, D. R., Oberley, L. W. and Weintraub, N. L.** (2001). H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* **276**, 29251-6.
- Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. and Xiong, Y.** (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-8.
- Li, Y., Lin, J. L., Reiter, R. S., Daniels, K., Soll, D. R. and Lin, J. J.** (2004). Caldesmon mutant defective in Ca(2+)-calmodulin binding interferes with assembly of stress fibers and affects cell morphology, growth and motility. *J Cell Sci* **117**, 3593-604.
- Liang, P. and Pardee, A. B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C. and Caruso, C.** (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing* **2**, 8.
- Linder, S. and Aepfelbacher, M.** (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**, 376-85.
- Linder, S. and Kopp, P.** (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci* **118**, 2079-82.
- Lindsten, K. and Dantuma, N. P.** (2003). Monitoring the ubiquitin/proteasome system in conformational diseases. *Ageing Res Rev* **2**, 433-49.

- Lindvall, C., Hou, M., Komurasaki, T., Zheng, C., Henriksson, M., Sedivy, J. M., Bjorkholm, M., Teh, B. T., Nordenskjold, M. and Xu, D.** (2003). Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene. *Cancer Res* **63**, 1743-7.
- Linnane, A. W., Kios, M. and Vitetta, L.** (2007). Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide. *Biogerontology* **8**, 445-67.
- Linskens, M. H., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D. and Villeponteau, B.** (1995). Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **23**, 3244-51.
- Liu, H. T., Gibson, C. W., Hirschhorn, R. R., Rittling, S., Baserga, R. and Mercer, W. E.** (1985). Expression of thymidine kinase and dihydrofolate reductase genes in mammalian ts mutants of the cell cycle. *J Biol Chem* **260**, 3269-74.
- Liu, P., Rudick, M. and Anderson, R. G.** (2002). Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem* **277**, 41295-8.
- Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M. and Alt, F. W.** (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**, 497-512.
- Loukides, S., Horvath, I., Wodehouse, T., Cole, P. J. and Barnes, P. J.** (1998). Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, 991-4.
- Louvet-Vallee, S.** (2000). ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell* **92**, 305-16.
- Luo, Y., Hurwitz, J. and Massague, J.** (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**, 159-61.
- Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T.** (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* **9**, 935-44.
- Mak, A. S., Watson, M. H., Litwin, C. M. and Wang, J. H.** (1991). Phosphorylation of caldesmon by cdc2 kinase. *J Biol Chem* **266**, 6678-81.
- Manevich, Y. and Fisher, A. B.** (2005). Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* **38**, 1422-32.
- Mangeat, P., Roy, C. and Martin, M.** (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* **9**, 187-92.
- Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V. and Mostov, K.** (2007). PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383-97.
- Mary, J., Vougie, S., Picot, C. R., Perichon, M., Petropoulos, I. and Friguet, B.** (2004). Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp Gerontol* **39**, 1117-23.
- May, P. and May, E.** (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-36.
- Mazars, G. R. and Jat, P. S.** (1997). Expression of p24, a novel p21Waf1/Cip1/Sdi1-related protein, correlates with measurement of the finite proliferative potential of rodent embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 151-6.
- McDermott, E. P. and O'Neill, L. A.** (2002). Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem* **277**, 7808-15.

- McManus, M. J., Boerner, J. L., Danielsen, A. J., Wang, Z., Matsumura, F. and Maihle, N. J.** (2000). An oncogenic epidermal growth factor receptor signals via a p21-activated kinase-caldesmon-myosin phosphotyrosine complex. *J Biol Chem* **275**, 35328-34.
- McMullen, M. E., Bryant, P. W., Glembotski, C. C., Vincent, P. A. and Pumiglia, K. M.** (2005). Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 20995-1003.
- Medrano, E. E., Im, S., Yang, F. and Abdel-Malek, Z. A.** (1995). Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res* **55**, 4047-52.
- Mendez, M. V., Stanley, A., Park, H. Y., Shon, K., Phillips, T. and Menzoian, J. O.** (1998). Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* **28**, 876-83.
- Mikula, M., Dzwonek, A., Karczmarski, J., Rubel, T., Dadlez, M., Wyrwicz, L. S., Bomsztyk, K. and Ostrowski, J.** (2006). Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics* **6**, 2395-406.
- Minamino, T. and Komuro, I.** (2006). [Antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* **43**, 347-50.
- Minamino, T. and Komuro, I.** (2007). Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res* **100**, 15-26.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H. and Komuro, I.** (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* **105**, 1541-4.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E.** (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* **23**, 6809-22.
- Mounier, N. and Arrigo, A. P.** (2002). Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* **7**, 167-76.
- Mueller, S. N., Rosen, E. M. and Levine, E. M.** (1980). Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* **207**, 889-91.
- Muller, K. C., Welker, L., Paasch, K., Feindt, B., Erpenbeck, V. J., Hohlfeld, J. M., Krug, N., Nakashima, M., Branscheid, D., Magnussen, H. et al.** (2006). Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro. *Respir Res* **7**, 32.
- Muller, T., Concannon, C. G., Ward, M. W., Walsh, C. M., Tirniceriu, A. L., Tribl, F., Kogel, D., Prehn, J. H. and Egensperger, R.** (2007). Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Mol Biol Cell* **18**, 201-10.
- Nagata, K., Puls, A., Futter, C., Aspenstrom, P., Schaefer, E., Nakata, T., Hirokawa, N. and Hall, A.** (1998). The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *Embo J* **17**, 149-58.
- Nakamura, N., Oshiro, N., Fukata, Y., Amano, M., Fukata, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Leung, T., Lim, L. and Kaibuchi, K.** (2000). Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes Cells* **5**, 571-81.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. and Lowe, S. W.** (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-16.
- Negre-Aminou, P., van Leeuwen, R. E., van Thiel, G. C., van den, I. P., de Jong, W. W., Quinlan, R. A. and Cohen, L. H.** (2002). Differential effect of simvastatin on activation of Rac(1) vs. activation of the heat shock protein 27-mediated pathway upon oxidative stress, in human smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **64**, 1483-91.

- New, L. and Han, J.** (1998). The p38 MAP kinase pathway and its biological function. *Trends Cardiovasc Med* **8**, 220-8.
- Ntais, C., Polycarpou, A. and Ioannidis, J. P.** (2004). Meta-analysis of the association of the cathepsin D Ala224Val gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease: a HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol* **159**, 527-36.
- Ono, K. and Han, J. I.** (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13.
- Ouwens, D. M., de Ruiter, N. D., van der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., van der Burgt, C., Kooistra, K., Bos, J. L., Maassen, J. A. and van Dam, H.** (2002). Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *Embo J* **21**, 3782-93.
- Pagano, G.** (2002). Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? *Hum Exp Toxicol* **21**, 77-81.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E. and Garrido, C.** (2003). HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* **23**, 5790-802.
- Park, S. K. and Prolla, T. A.** (2005). Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res Rev* **4**, 55-65.
- Park, W. Y., Park, J. S., Cho, K. A., Kim, D. I., Ko, Y. G., Seo, J. S. and Park, S. C.** (2000). Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells. *J Biol Chem* **275**, 20847-52.
- Parton, R. G., Hanzal-Bayer, M. and Hancock, J. F.** (2006). Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci* **119**, 787-96.
- Parton, R. G. and Simons, K.** (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-94.
- Pascal, T.** (2006). Transcriptomic and functional approach of replicative senescence and premature senescence induced by repeated subcytotoxic stress with tert-butylhydroperoxide and ethanol. In *URBC*, pp. 141. Namur: FUNDP.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabee, A. F., Bertholet, V., Remacle, J. and Toussaint, O.** (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett* **579**, 3651-9.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S. and Arrigo, A. P.** (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* **22**, 816-34.
- Petersen, S., Saretzki, G. and von Zglinicki, T.** (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* **239**, 152-60.
- Petropoulou, C., Trougakos, I. P., Kolettas, E., Toussaint, O. and Gonos, E. S.** (2001). Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS Lett* **509**, 287-97.
- Pichler, R. H., Bassuk, J. A., Hugo, C., Reed, M. J., Eng, E., Gordon, K. L., Pippin, J., Alpers, C. E., Couser, W. G., Sage, E. H. et al.** (1996). SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro. *Am J Pathol* **148**, 1153-67.
- Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q. and Spector, D. L.** (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**, 249-63.
- Quest, A. F., Leyton, L. and Parraga, M.** (2004). Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol* **82**, 129-44.

- Rabilloud, T.** (2002). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10.
- Rabilloud, T.** (2003). Membrane proteins ride shotgun. *Nat Biotechnol* **21**, 508-10.
- Raman, M., Chen, W. and Cobb, M. H.** (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-12.
- Ramirez, R. D., Morales, C. P., Herbert, B. S., Rohde, J. M., Passons, C., Shay, J. W. and Wright, W. E.** (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15**, 398-403.
- Razani, B., Zhang, X. L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E. P. and Lisanti, M. P.** (2001). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem* **276**, 6727-38.
- Reisinger, V. and Eichacker, L. A.** (2006). Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. *Proteomics* **6 Suppl 2**, 6-15.
- Remacle, J. A., Houbion, A. and Houben, A.** (1980). Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells. *Biochim Biophys Acta* **630**, 57-70.
- Rescher, U. and Gerke, V.** (2008). S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch* **455**, 575-82.
- Rheinwald, J. G. and Green, H.** (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43.
- Rheinwald, J. G., Hahn, W. C., Ramsey, M. R., Wu, J. Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C. and O'Toole, K. M.** (2002). A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* **22**, 5157-72.
- Ridley, A. J.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-22.
- Riley, P. A.** (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* **65**, 27-33.
- Roberts, P. J. and Der, C. J.** (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-310.
- Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K. and Albiez, M.** (1989). Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp Cell Res* **180**, 84-93.
- Rufer, N. and Nabholz, M.** (2003). [Telomerase, elixir of life for human cells?]. *Med Sci (Paris)* **19**, 345-50.
- Sanna, E., Miotti, S., Mazzi, M., De Santis, G., Canevari, S. and Tomassetti, A.** (2007). Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* **313**, 1307-17.
- Saretzki, G., Feng, J., von Zglinicki, T. and Villeponteau, B.** (1998). Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53**, B438-42.
- Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R. E. and von Zglinicki, T.** (1999). Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* **18**, 5148-58.
- Sargiacomo, M., Scherer, P. E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K. S., Sanders, M. C. and Lisanti, M. P.** (1995). Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9407-11.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blandschun, R. and Wenk, J.** (1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* **378**, 1247-57.
- Schiller, J., Suss, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Muller, M., Petkovic, M., Spalteholz, H., Zschornig, O. and Arnold, K.** (2004a). Matrix-assisted laser desorption and

ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res* **43**, 449-88.

Schiller, M., Javelaud, D. and Mauviel, A. (2004b). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* **35**, 83-92.

Schrader, M. and Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* **122**, 383-93.

Schwencke, C., Braun-Dullaeus, R. C., Wunderlich, C. and Strasser, R. H. (2006). Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res* **70**, 42-9.

Seo, M., Cho, C. H., Lee, Y. I., Shin, E. Y., Park, D., Bae, C. D., Lee, J. W., Lee, E. S. and Juhnn, Y. S. (2004). Cdc42-dependent mediation of UV-induced p38 activation by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem* **279**, 17366-75.

Serrano, M. and Blasco, M. A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 748-53.

Serrano, M. and Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 715-22.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. and DePinho, R. A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**, 27-37.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602.

Shack, S., Wang, X. T., Kokkonen, G. C., Gorospe, M., Longo, D. L. and Holbrook, N. J. (2003). Caveolin-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway increases arsenite cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **23**, 2407-14.

Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp Gerontol* **39**, 1751-9.

Shay, J. W. and Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 72-6.

Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D. and Funk, W. D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**, 939-45.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.

Shi, H., Shi, X. and Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* **255**, 67-78.

Shu, L., Lee, L., Chang, Y., Holzman, L. B., Edwards, C. A., Shelden, E. and Shayman, J. A. (2000). Caveolar structure and protein sorting are maintained in NIH 3T3 cells independent of glycosphingolipid depletion. *Arch Biochem Biophys* **373**, 83-90.

Singh, P. (2007). Role of Annexin-II in GI cancers: interaction with gastrins/progastrins. *Cancer Lett* **252**, 19-35.

Singh, T. K. and Liu, L. (2000). Modification of cysteine residues by N-ethylmaleimide inhibits annexin II tetramer mediated liposome aggregation. *Arch Biochem Biophys* **381**, 235-40.

Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K. J. and Grune, T. (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *Faseb J* **14**, 2503-10.

Smart, E. J., De Rose, R. A. and Farber, S. A. (2004). Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3450-5.

Somara, S. and Bitar, K. N. (2006). Phosphorylated HSP27 modulates the association of phosphorylated caldesmon with tropomyosin in colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G630-9.

- Souchelnytskyi, S.** (2005). Proteomics of TGF-beta signaling and its impact on breast cancer. *Expert Rev Proteomics* **2**, 925-35.
- Spinardi, L. and Marchisio, P. C.** (2006). Podosomes as smart regulators of cellular adhesion. *Eur J Cell Biol* **85**, 191-4.
- Stahlhut, M., Sandvig, K. and van Deurs, B.** (2000). Caveolae: uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth, and cancer. *Exp Cell Res* **261**, 111-8.
- Stan, R. V.** (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 334-48.
- Stein, G. S., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. and Owen, T. A.** (2002). Cell cycle: Encyclopedia of Life Sciences, Nature publishing group.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P. and Gaestel, M.** (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* **313**, 307-13.
- Sun, G. Y., Horrocks, L. A. and Farooqui, A. A.** (2007). The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J Neurochem* **103**, 1-16.
- Sznajder, J. I., Fraiman, A., Hall, J. B., Sanders, W., Schmidt, G., Crawford, G., Nahum, A., Factor, P. and Wood, L. D.** (1989). Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* **96**, 606-12.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariatì, S., Cohen, P. and Comb, M. J.** (1996). FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J* **15**, 4629-42.
- Tanaka, J., Watanabe, T., Nakamura, N. and Sobue, K.** (1993). Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. *J Cell Sci* **104** (Pt 2), 595-606.
- ten Dijke, P. and Hill, C. S.** (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-73.
- ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. and Hordijk, P. L.** (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**, 759-69.
- Thannickal, V. J., Aldweib, K. D. and Fanburg, B. L.** (1998). Tyrosine phosphorylation regulates H2O2 production in lung fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* **273**, 23611-5.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L.** (1995). Activation of an H2O2-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* **270**, 30334-8.
- Thiel, C., Osborn, M. and Gerke, V.** (1992). The tight association of the tyrosine kinase substrate annexin II with the submembranous cytoskeleton depends on intact p11- and Ca(2+)-binding sites. *J Cell Sci* **103** (Pt 3), 733-42.
- Tibbles, L. A., Ing, Y. L., Kiefer, F., Chan, J., Iscove, N., Woodgett, J. R. and Lassam, N. J.** (1996). MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *Embo J* **15**, 7026-35.
- Tice, R. R., Schneider, E. L., Kram, D. and Thorne, P.** (1979). Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J Exp Med* **149**, 1029-41.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J.** (1992). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech Ageing Dev* **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Medrano, E. E. and von Zglinicki, T.** (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* **35**, 927-45.

- Toussaint, O., Michiels, C., Raes, M. and Remacle, J.** (1995). Cellular aging and the importance of energetic factors. *Exp Gerontol* **30**, 1-22.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J. F., Pascal, T., Frippiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Royer, V. and Chainiaux, F.** (2002). From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1415-29.
- Tran Quang, C., Gautreau, A., Arpin, M. and Treisman, R.** (2000). Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *Embo J* **19**, 4565-76.
- Tresini, M., Lorenzini, A., Frisoni, L., Allen, R. G. and Cristofalo, V. J.** (2001). Lack of Elk-1 phosphorylation and dysregulation of the extracellular regulated kinase signaling pathway in senescent human fibroblast. *Exp Cell Res* **269**, 287-300.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y. M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R. et al.** (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417-23.
- Troen, B. R.** (2003). The biology of aging. *Mt Sinai J Med* **70**, 3-22.
- Turjanski, A. G., Vaque, J. P. and Gutkind, J. S.** (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* **26**, 3240-53.
- Uittenbogaard, A., Everson, W. V., Matveev, S. V. and Smart, E. J.** (2002). Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. *J Biol Chem* **277**, 4925-31.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y. and Smart, E. J.** (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J Biol Chem* **273**, 6525-32.
- Upton, A. L. and Moss, S. E.** (1994). Molecular cloning of a novel N-terminal variant of annexin II from rat basophilic leukaemia cells. *Biochem J* **302** (Pt 2), 425-8.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J.** (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 44-84.
- Vanni, C., Parodi, A., Mancini, P., Visco, V., Ottaviano, C., Torrisi, M. R. and Eva, A.** (2004). Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl in vivo. *Oncogene* **23**, 4098-106.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D. and Caruso, C.** (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* **128**, 83-91.
- Verrecchia, F. and Mauviel, A.** (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* **13**, 3056-62.
- Vinals, F. and Pouyssegur, J.** (2001). Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol* **21**, 7218-30.
- Volonte, D., Galbiati, F., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P.** (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* **276**, 8094-103.
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P. and Galbiati, F.** (2002). Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell* **13**, 2502-17.
- von Zglinicki, T.** (2000). Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 99-110.

- von Zglinicki, T.** (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* **27**, 339-44.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W. and Lotze, C.** (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* **220**, 186-93.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B.** (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8.
- Wahl, G. M. and Carr, A. M.** (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* **3**, E277-86.
- Wallin, E. and von Heijne, G.** (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* **7**, 1029-38.
- Wang, Q., Turlington, A., Heo, S., Blanco, A., Tian, J., Xie, Z., Yan, B. and Wan, Y.** (2005). Extracellular matrix activity and caveolae events contribute to cell surface receptor activation that leads to MAP kinase activation in response to UV irradiation in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med* **15**, 633-40.
- Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S. and Sun, P.** (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* **22**, 3389-403.
- Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N. et al.** (1997). Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**, 23668-74.
- Washburn, M. P., Wolters, D. and Yates, J. R., 3rd.** (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* **19**, 242-7.
- Watanabe, Y., Lee, S. W., Detmar, M., Ajioka, I. and Dvorak, H. F.** (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene* **14**, 2025-32.
- Weiss, R. H.** (2003). p21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers. *Cancer Cell* **4**, 425-9.
- Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E. and Warscheid, B.** (2007). Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340-50.
- Williams, T. M. and Lisanti, M. P.** (2004). The caveolin proteins. *Genome Biol* **5**, 214.
- Willis, B. C. and Borok, Z.** (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L525-34.
- Witkowski, J. A.** (1987). Cell aging in vitro: a historical perspective. *Exp Gerontol* **22**, 231-248.
- Wong, H. and Riabowol, K.** (1996). Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol* **31**, 311-25.
- Wong, J. W., Shi, B., Farboud, B., McClaren, M., Shibamoto, T., Cross, C. E. and Isseroff, R. R.** (2000). Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **115**, 427-34.
- Wright, W. E. and Shay, J. W.** (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 98-103.
- Wu, W. W., Wang, G., Baek, S. J. and Shen, R. F.** (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* **5**, 651-8.

- Xue, L., Wu, J., Zheng, W., Wang, P., Li, J., Zhang, Z. and Tong, T. (2004). Sp1 is involved in the transcriptional activation of p16(INK4) by p21(Waf1) in HeLa cells. *FEBS Lett* **564**, 199-204.
- Yamakita, Y., Yamashiro, S. and Matsumura, F. (1992). Characterization of mitotically phosphorylated caldesmon. *J Biol Chem* **267**, 12022-9.
- Yamboliev, I. A., Hedges, J. C., Mutnick, J. L., Adam, L. P. and Gerthoffer, W. T. (2000). Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1899-907.
- Yang, H. S. and Hinds, P. W. (2003). Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Mol Cell* **11**, 1163-76.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-12.
- Yoshii, S., Tanaka, M., Otsuki, Y., Wang, D. Y., Guo, R. J., Zhu, Y., Takeda, R., Hanai, H., Kaneko, E. and Sugimura, H. (1999). alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* **18**, 5680-90.
- Yu, B. P. (2005). Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction. *Mech Ageing Dev* **126**, 1003-10.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**, 163-76.
- Zangar, R. C., Davydov, D. R. and Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**, 316-31.
- Zdanov, S., Debacq-Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2006). Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett* **580**, 6455-63.
- Zhang, B., Peng, F., Wu, D., Ingram, A. J., Gao, B. and Krepinsky, J. C. (2007). Caveolin-1 phosphorylation is required for stretch-induced EGFR and Akt activation in mesangial cells. *Cell Signal* **19**, 1690-700.
- Zhang, H., Hannon, G. J. and Beach, D. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* **8**, 1750-8.
- Zhang, H. J., Xu, L., Drake, V. J., Xie, L., Oberley, L. W. and Kregel, K. C. (2003). Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. *Faseb J* **17**, 2293-5.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J. and Bokoch, G. M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**, 23934-6.
- Zheng, P. P., Sieuwerts, A. M., Luiders, T. M., van der Weiden, M., Sillevius-Smitt, P. A. and Kros, J. M. (2004). Differential expression of splicing variants of the human caldesmon gene (CALD1) in glioma neovascularization versus normal brain microvasculature. *Am J Pathol* **164**, 2217-28.
- Zhou, H., Ranish, J. A., Watts, J. D. and Aebersold, R. (2002). Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **20**, 512-5.

ANNEXES

Annexe 1 : Matériel supplémentaire reprenant les données obtenues en spectrométrie de masse et concernant l'étude de la néosynthèse protéique et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la sénescence prématurée induite par un stress subléthal avec H₂O₂

Nous présentons ces données en regroupant 2 pages par feuille.

Table S.3: Results from MALDI-MS data alone or in combination with MALDI-MS/MS data.

A: Increased intensity

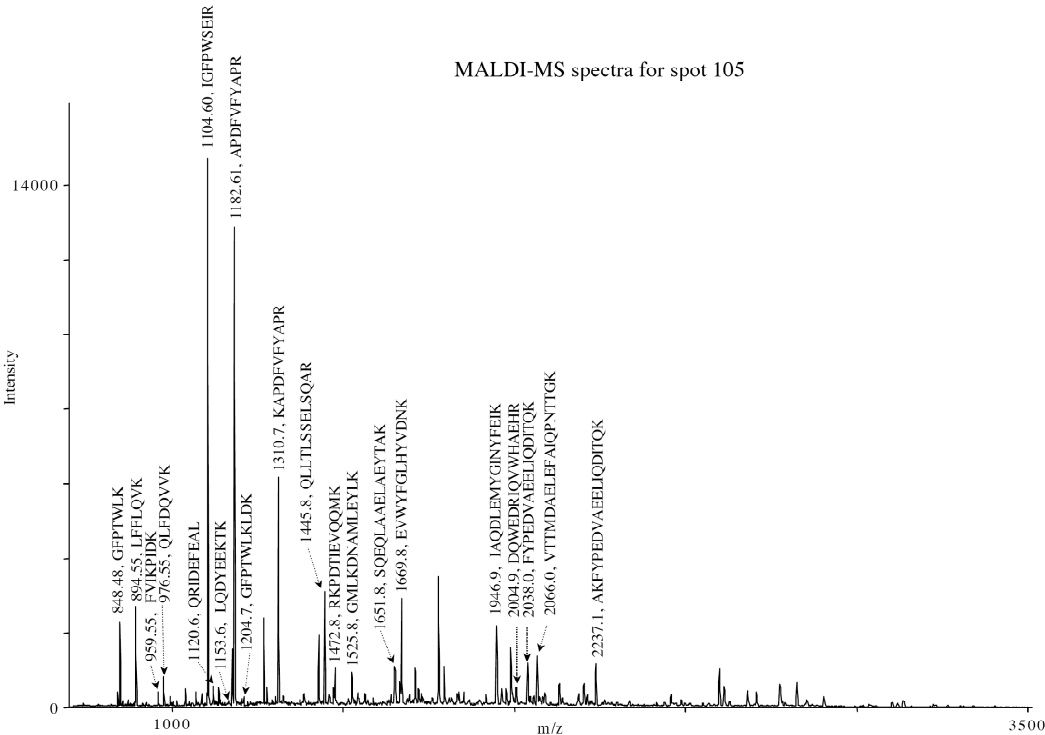
Spot # gil46249758 Mass: 69199 Score: 128 Expect: 2.9e-07 Queries matched and confirmed: 20
105 Villin 2 [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
848.47	847.46	847.46	0.00	54	60	0	GFPTWLK
894.54	893.53	893.54	-0.00	101	107	0	LFFLQVK
959.55	958.54	958.59	-0.05	255	262	0	FVIKPIDK
976.55	975.54	975.54	0.01	28	35	0	QLFDQVVK
1104.60	1103.59	1103.58	0.01	238	246	0	IGFPWSEIR
1120.59	1119.58	1119.56	0.02	578	586	1	QRIDEFEAL
1153.59	1152.59	1152.57	0.02	351	359	1	LQDYEEKTK
1182.61	1181.60	1181.59	0.01	264	273	0	APDFVFYAPR
1204.66	1203.65	1203.67	-0.01	54	63	1	GFPTWLKLDK
1310.71	1309.70	1309.68	0.02	263	273	1	KAPDFVFYAPR
1445.81	1444.80	1444.79	0.01	530	542	0	QLLTLSSELSQAR
1472.80	1471.79	1471.78	0.01	295	306	1	RKPDTEVQQMK
1525.78	1524.78	1524.77	0.01	181	193	1	GMIKDNAMILEYK
1651.83	1650.83	1650.81	0.02	413	427	0	SQEQLAAELAEYTAK
1669.82	1668.81	1668.79	0.02	41	53	0	EVWYFGLHYVDNK
1946.96	1945.95	1945.95	0.00	194	209	0	IAQDLEMYGINYFEIK
2004.95	2003.94	2003.94	0.01	166	180	1	DQWEDRIQVWHAHR
2038.01	2037.00	2036.99	0.01	84	100	0	FYPEDVAEELIQDITQK
2066.02	2065.01	2065.00	0.01	9	27	0	VTTMDAELEFAIQPNTTGK
2237.14	2236.13	2236.13	0.00	82	100	1	AKFYPEDVAEELIQDITQK

No match to: 1014.52, 1039.64, 1136.59, 1142.55, 1166.65, 1209.67, 1267.71, 1325.72, 1428.77, 1533.81, 1562.83, 1570.89, 1586.83, 1628.90, 1633.85, 1648.85, 1665.92, 1692.86, 1709.88, 1719.90, 1726.87, 1777.86, 1793.86, 1809.88, 1816.98, 1832.88, 1917.02, 1976.00, 1989.01, 2045.11, 2056.09, 2088.10, 2131.11, 2202.17, 2456.30, 2487.21, 2597.24, 2611.20, 2680.28, 2774.45, 2823.40, 2853.39

Number of mass values searched: 64
Number of mass values matched: 22

Number of mass values no matched: 42



Spot # gil452892 Mass: 33712 Score: 100 Expect: 0.0002 Queries matched and confirmed: 12
 126 caldesmon

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
903.50	902.49	902.49	0.01	250	256	0	INEWLTK
1049.56	1048.55	1048.54	0.01	1	8	1	EFMTHKLK + Oxidation (M)
1203.64	1202.64	1202.66	-0.03	238	249	1	ETAGLKVGVSRR
1358.67	1357.67	1357.65	0.02	9	20	0	HTENTFSRPGGR
1518.80	1517.79	1517.71	0.08	123	135	2	RQKMPEDGLSDDK
1599.84	1598.83	1598.83	0.00	7	20	1	LKHTENTFSRPGGR
1720.87	1719.86	1719.92	-0.06	145	159	2	GSSLKIEERAFLNK
1810.92	1809.92	1809.91	0.01	179	194	1	IDSRLQYTSALIEGK
1893.95	1892.94	1893.01	-0.07	263	280	1	SPAPKPSDLRPGDVSSKR
1991.09	1990.08	1990.08	-0.00	195	214	0	SAKPTKPAASDLPVPAEGVR
2047.04	2046.03	2046.04	-0.01	223	243	1	GNVFSSPTAAGTPNKETAGLK
2506.29	2505.29	2505.29	-0.01	257	280	2	TPDGNKSPAPKPSDLRPGDVSSKR

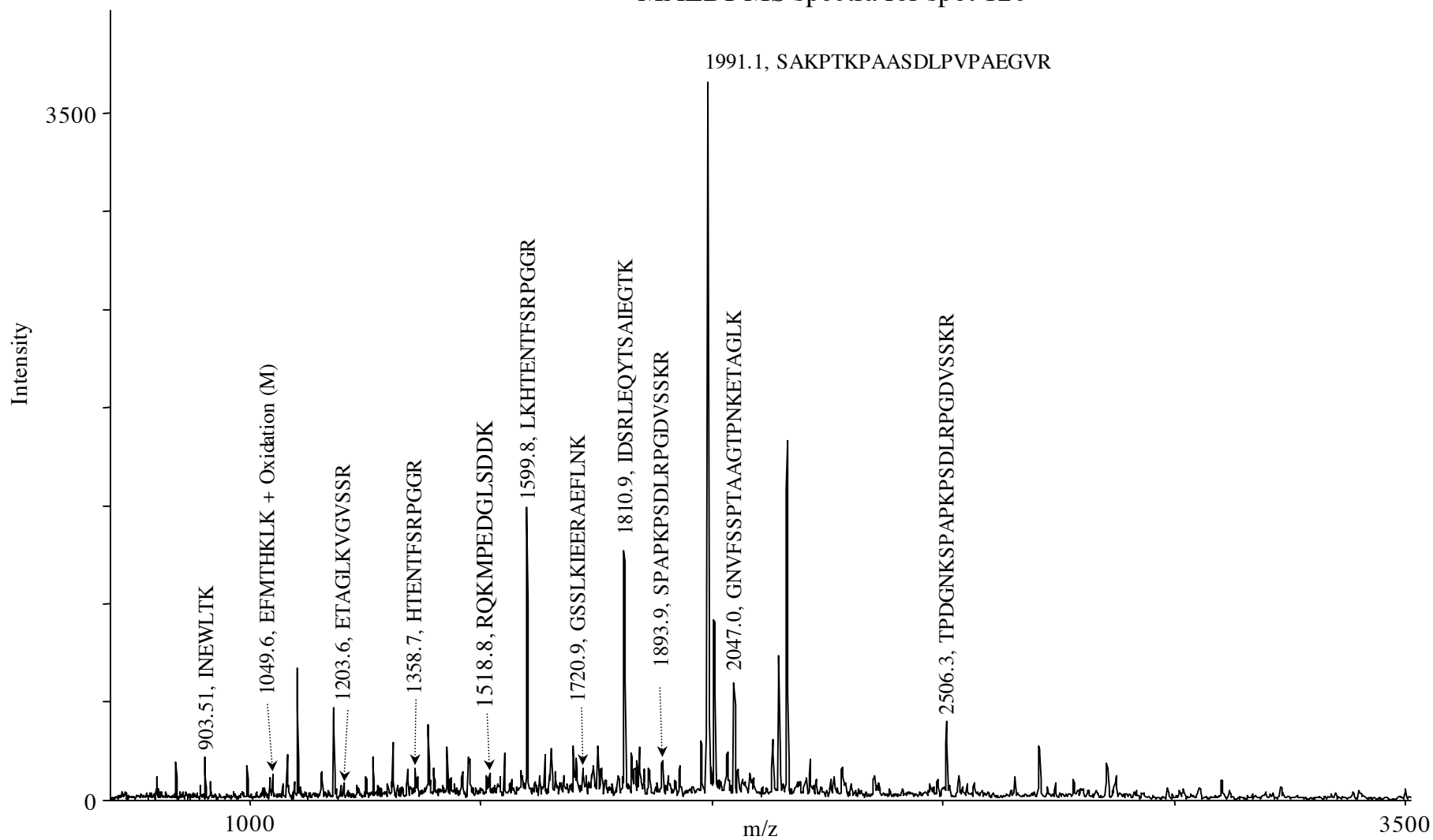
No match to: 996.05, 1044.59, 1104.59, 1182.60, 1267.69, 1310.69, 1386.76, 1398.76, 1427.74, 1433.69, 1459.74, 1473.81, 1513.81, 1550.93, 1626.79, 1652.94, 1679.85, 1699.97, 1752.83, 1825.95, 1842.96, 1863.95, 1890.94, 1928.94, 1976.02, 1987.99, 2005.01, 2033.15, 2056.08, 2131.10, 2144.09, 2161.13, 2281.12, 2533.30, 2853.37

Number of mass values searched: 48

Number of mass values matched: 13

Number of mass values no matched: 35

MALDI-MS spectra for spot 126



Spot # gil7549809 Mass: 71279 Score: 371 Expect: 1.5e-31 Queries matched and confirmed: 22

243 plastin ; T isoform [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1069.62	1068.61	1068.62	-0.01	267	275	0	LSPEELLLR
1233.68	1232.68	1232.68	-0.00	237	247	0	IGLFADIELSR
1363.76	1362.75	1362.77	-0.01	365	376	0	LNLA FVANLFNK
1414.78	1413.77	1413.78	-0.01	301	312	0	AYFHLLNQIAPK
1428.72	1427.71	1427.72	-0.01	519	530	0	ANDDIIVNWVNR
1447.65	1446.64	1446.65	-0.01	614	625	0	MVMTVFACLMGR + 2 Oxidation (M)
1458.74	1457.74	1457.75	-0.02	351	364	0	QFVTPADVVS GNP K
1502.74	1501.73	1501.74	-0.01	169	181	0	MINLSVPDTIDER
1599.88	1598.87	1598.89	-0.02	600	613	0	VYALPEDLVEVKPK
1616.74	1615.74	1615.75	-0.02	276	288	0	WANFHLENSGWQK
1640.81	1639.80	1639.80	-0.00	145	158	0	HVIPMNPNTDDL K
1720.88	1719.88	1719.88	-0.00	504	518	1	RYTLNVLEDLGDGQK
1763.87	1762.87	1762.88	-0.02	72	85	0	ISFDEFVYIFQEVK
1867.88	1866.88	1866.88	-0.00	321	336	1	IDINMSGFNETDDL K R
2064.01	2063.00	2063.03	-0.02	69	85	1	DGKISFDEFVYIFQEVK
2116.07	2115.06	2115.09	-0.03	248	266	1	NEALAALLRDGETLEELMK
2231.13	2230.13	2230.14	-0.01	257	275	1	DGETLEELMKLSPEELLLR + Oxidation (M)
2313.06	2312.05	2312.08	-0.03	24	42	0	VDLNSNGFICDYELHEL K
2589.23	2588.23	2588.28	-0.05	377	398	0	YPALTKPENQDIDWTLLEGETR
2804.44	2803.43	2803.47	-0.04	548	573	0	TISSSLAVVDLIDAIQPGCINYDLVK
2974.40	2973.40	2973.48	-0.09	505	530	1	YTLNVLEDLGDGQKANDDIIVNWVNR
3059.50	3058.49	3058.59	-0.10	476	503	0	FSLVGIGGQDLNDGNQTLTLALVQLMR

No match to: 785.40, 917.28, 1153.61, 1267.69, 1415.77, 1441.72, 1526.06, 1693.77, 1703.88, 1782.89, 1970.99, 2055.05, 2068.96, 2102.05, 2122.05, 2131.07, 2179.09, 2247.13, 3104.53

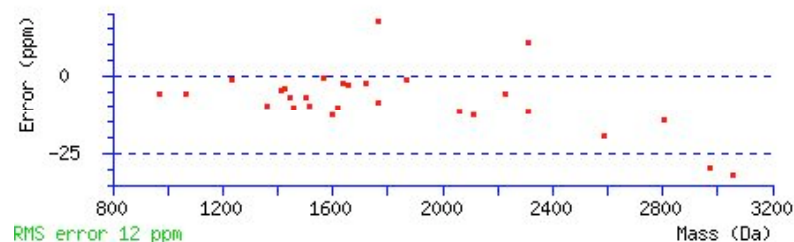
Number of mass values searched: 47

Number of mass values matched: 28

Number of mass values no matched: 19

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
243	24 - 42	2313.0589	2312.0516	2312.0782	-12	0 VDLNSNGFICDYELHELFK (No match)
	24 - 42	2313.1100	2312.1027	2312.0782	11	0 VDLNSNGFICDYELHELFK (Ions score 38, e-value 0.21)
T Plastin	69 - 85	2064.0087	2063.0014	2063.0251	-11	1 DGKISFDEFVYIFQEVK (No match)
	72 - 85	1763.8738	1762.8665	1762.8817	-9	0 ISFDEFVYIFQEVK (No match)
	72 - 85	1763.9200	1762.9127	1762.8817	18	0 ISFDEFVYIFQEVK (Ions score 73, e-value 9.8e-0.5)
	145 - 158	1640.8058	1639.7985	1639.8028	-3	0 HVIPMNPNTDDLK (No match)
	169 - 181	1502.7411	1501.7338	1501.7446	-7	0 MINLSVPDTIDER (No match)
	237 - 247	1233.6824	1232.6751	1232.6764	-1	0 IGLFADIELSR (No match)
	248 - 266	2116.0686	2115.0613	2115.0881	-13	1 NEALAALLRDGETLEELMK (No match)
	257 - 275	2231.1343	2230.1270	2230.1402	-6	1 DGETLEELMKLSPEELLLR Oxidation (M) (No match)
	267 - 275	1069.6191	1068.6118	1068.6179	-6	0 LSPEELLLR (No match)
	276 - 288	1616.7433	1615.7360	1615.7531	-11	0 WANFHLENSGWQK (No match)
	301 - 312	1414.7773	1413.7700	1413.7768	-5	0 AYFHLLNQIAPK (No match)
	321 - 336	1867.8830	1866.8757	1866.8781	-1	1 IDINMSGFNETDDLKR (No match)
	351 - 364	1458.7432	1457.7359	1457.7514	-11	0 QFVTPADVVSQNP (No match)
	365 - 376	1363.7602	1362.7529	1362.7659	-10	0 LNLAFFVANLFNK (No match)
	377 - 398	2589.2326	2588.2253	2588.2758	-19	0 YPALTKEPNDIDWTLLGETR (No match)
	476 - 503	3059.4998	3058.4925	3058.5909	-32	0 FSLVGIGGQDLNDGNQTLTLALVWQLMR (No match)
	504 - 518	1720.8823	1719.8750	1719.8791	-2	1 RYTLNVLEDLGDGQK (No match)
	505 - 530	2974.4029	2973.3956	2973.4831	-29	1 YTLNVLEDLGDGQKANDDIIVNWVNR (No match)
	519 - 530	1428.7174	1427.7101	1427.7157	-4	0 ANDDIIVNWVNR (No match)
	548 - 573	2804.4351	2803.4278	2803.4677	-14	0 TISSSLAVVDLIDAIQPGCINYDLVK (No match)
	600 - 613	1599.8794	1598.8721	1598.8919	-12	0 VYALPEDLVEVKPK (No match)
	614 - 625	1447.6467	1446.6394	1446.6491	-7	0 MVMTVFACLMGR 2 Oxidation (M) (No match)



Spot # gil15277503 Mass: 40536 Score: 344 Expect: 7.3e-29 Queries matched and confirmed: 13

710 ACTB protein [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
923.57	922.57	922.56	0.01	314	321	1	IIAPPERK
1036.65	1035.64	1035.64	-0.00	312	320	1	IKIIAPPER
1515.74	1514.73	1514.74	-0.01	70	80	0	IWHHTFYNELR
1623.84	1622.83	1622.83	-0.00	163	176	1	LDLAGRDLTDYLMK
1629.83	1628.83	1628.82	0.01	182	195	1	GYSFTTTAEREIVR
1790.88	1789.87	1789.88	-0.01	224	239	0	SYELPDGQVITIGNER
1954.05	1953.04	1953.06	-0.01	81	98	0	VAPEEHPVLLTEAPLNPK
2215.06	2214.05	2214.06	-0.01	277	297	0	DLYANTVLSGGTMYPGIADR
2343.14	2342.14	2342.16	-0.02	276	297	1	KDLYANTVLSGGTMYPGIADR
2550.15	2549.15	2549.17	-0.02	201	223	0	LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK
2588.17	2587.16	2587.30	-0.14	48	69	1	GILTLKYPIEHGIVTNWDDMEK + Oxidation (M)
3183.57	3182.57	3182.61	-0.04	133	162	0	TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR
3231.46	3230.46	3230.45	0.00	242	269	0	CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMK

No match to: 977.54, 1073.57, 1143.62, 1164.74, 1197.69, 1222.63, 1239.67, 1267.69, 1427.72, 1459.70, 1531.76, 1547.75, 1562.82, 1570.89, 1586.77, 1669.88, 1701.90, 1832.87, 1976.01, 2007.94, 2056.10, 2072.07, 2089.01, 2131.10, 2146.07, 2185.08, 2202.07, 2314.15, 2415.18, 2487.20, 2706.23, 2853.37, 3458.57

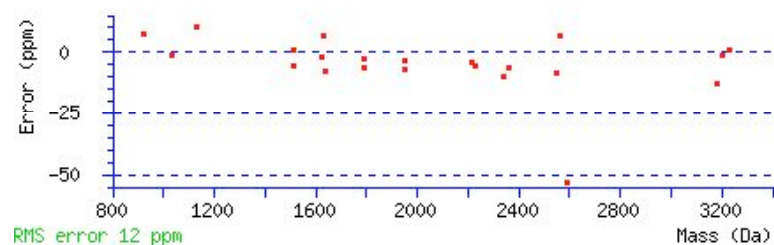
Number of mass values searched: 55

Number of mass values matched: 22

Number of mass values no matched: 33

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
710	48 - 69	2588.1691	2587.1618	2587.2991	-53	1 GILTLKYPIEHGIVTNWDDMEK Oxidation (M) (No match)
β-actin	70 - 80	1515.7404	1514.7331	1514.7418	-6	0 IWHHTFYNELR (No match)
	81 - 98	1954.0500	1953.0427	1953.0571	-7	0 VAPEEHPVLLTEAPLNPK (Ions score 107, e-value 3e-0.8)
	81 - 98	1954.0573	1953.0500	1953.0571	-4	0 VAPEEHPVLLTEAPLNPK (No match)
	133 - 162	3183.5737	3182.5664	3182.6069	-13	0 TTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR (No match)
	163 - 176	1623.8373	1622.8300	1622.8338	-2	1 LDLAGRDLTDYLMK (No match)
	182 - 195	1629.8336	1628.8263	1628.8158	6	1 GYSFTTTAEREIVR (No match)
	201 - 223	2550.1529	2549.1456	2549.1665	-8	0 LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK (No match)
	224 - 239	1790.8800	1789.8727	1789.8846	-7	0 SYELPDGQVITIGNER (Ions score 81, e-value 1.4e-0.5)
	224 - 239	1790.8876	1789.8803	1789.8846	-2	0 SYELPDGQVITIGNER (No match)
	242 - 269	3231.4646	3230.4573	3230.4544	1	0 CPEALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMK (No match)
	276 - 297	2343.1423	2342.1350	2342.1576	-10	1 KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR (No match)
	277 - 297	2215.0604	2214.0531	2214.0626	-4	0 DLYANTVLSGGTTMYPGIADR (No match)
	312 - 320	1036.6502	1035.6429	1035.6440	-1	1 IKIAPPER (No match)
	314 - 321	923.5742	922.5669	922.5600	8	1 IAPPERK (No match)



Spot # gil5031981 Mass: 34555 Score: 84 Expect: 0.0067 Queries matched and confirmed: 9

721 26S proteasome-associated pad1 homolog [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
819.47	818.46	818.46	-0.00	155	161	0	VVIDAFR
996.60	995.59	995.59	-0.00	216	223	1	MLNLHKK
1004.59	1003.58	1003.58	0.00	153	161	1	GKVVIDAFR
1324.78	1323.78	1323.78	0.00	140	152	0	AVAVVVDPIQSVK
1329.67	1328.66	1328.65	0.01	199	208	0	HYYSITINYR
1594.83	1593.82	1593.81	0.01	162	175	0	LINANMMVLGHEPR
2429.12	2428.11	2428.15	-0.04	47	68	0	AGVPMEVMGLMLGEFVDDYTVR
2512.33	2511.33	2511.37	-0.04	176	198	0	QTTSNLGHLNKPSIQALIHGLNR
2691.32	2690.32	2690.36	-0.05	69	94	0	VIDVFAMPQSGTGVSVEAVDPVFQAK

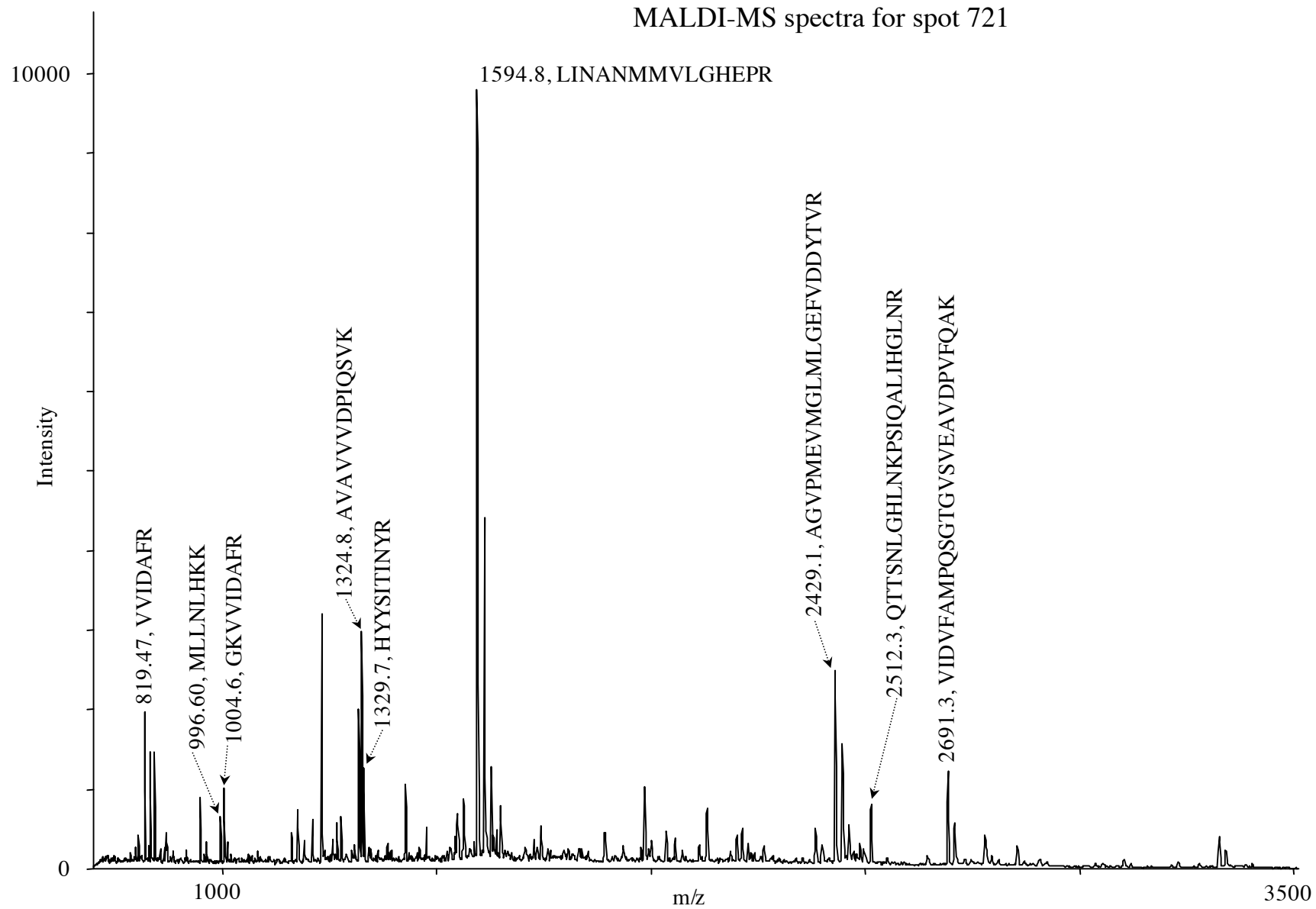
No match to: 948.53, 964.53, 995.49, 1161.65, 1191.62, 1209.66, 1231.70, 1256.70, 1267.70, 1318.74, 1427.74, 1562.82, 1632.81, 1648.82, 1726.88, 1733.92, 1743.01, 1891.82, 1975.98, 1983.85, 1999.85, 2035.13, 2056.07, 2111.96, 2131.10, 2199.13, 2261.11, 2262.10, 2487.18, 2495.28, 2777.21, 2793.23, 2853.35, 2905.40, 3101.30

Number of mass values searched: 50

Number of mass values matched: 15

Number of mass values no matched: 35

MALDI-MS spectra for spot 721



Spot # gil4506179 Mass: 29822 Score: 296 Expect: 3e-25 Queries matched and confirmed: 12

752 proteasome alpha 1 subunit

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
816.51	815.51	815.51	-0.00	108	115	0	LVSLIGSK
886.53	885.52	885.53	-0.00	209	217	0	NVSGIVGK
953.48	952.47	952.46	0.01	83	89	0	LLCNFMR
1107.70	1106.69	1106.69	0.00	42	51	1	THAVLVALKR
1332.76	1331.75	1331.73	0.02	97	107	0	FVFDRPLPVS
1431.74	1430.73	1430.72	0.01	19	30	0	IHQIEYAMEAVK
1685.93	1684.92	1684.90	0.02	194	208	1	ALRETLPAEQDLTK
1778.83	1777.82	1777.80	0.02	4	18	0	NQYDNDVTWSPQGR
1880.85	1879.84	1879.83	0.02	175	189	0	HMSEFMECNLNLVK
2086.15	2085.14	2085.13	0.01	63	82	0	ILHVDNHIGISIAGLTADAR
2214.24	2213.24	2213.23	0.01	62	82	1	KILHVDNHIGISIAGLTADAR
3126.48	3125.47	3125.48	-0.01	218	243	1	DLEFTIYDDDDVSPFLEGLEERPQRK

No match to: 832.32, 862.46, 870.55, 878.45, 896.45, 1062.64, 1231.70, 1267.71, 1354.74, 1370.71, 1386.69, 1427.74, 1453.74, 1459.72, 1529.89, 1582.82, 1586.78, 1609.85, 1638.88, 1648.86, 1726.89, 1771.92, 1775.04, 1935.91, 1976.03, 1979.05, 2056.10, 2131.13, 2299.17, 2348.21, 2415.19, 2487.22, 2549.19, 2648.25, 2664.33, 2706.22, 2853.39, 3338.72

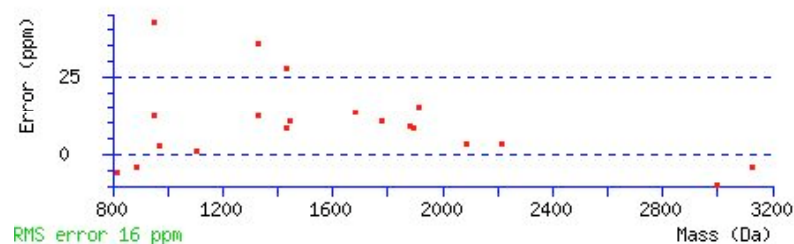
Number of mass values searched: 58

Number of mass values matched: 20

Number of mass values no matched: 38

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
752	4 - 18	1778.8279	1777.8206	1777.8019	11	0 NQYDNDVTWSPQGR (No match)
proteasome alpha 1 subunit	19 - 30	1431.7420	1430.7347	1430.7227	8	0 IHQIEYAMEAVK (No match)
	19 - 30	1431.7700	1430.7627	1430.7227	28	0 IHQIEYAMEAVK (Ions score 78, e-value 2.4e-0.6)
	42 - 51	1107.7006	1106.6933	1106.6924	1	1 THAVLVALKR (No match)
	62 - 82	2214.2432	2213.2359	2213.2280	4	1 KILHVDNHIGISIAGLTADAR (No match)
	63 - 82	2086.1470	2085.1397	2085.1330	3	0 ILHVDNHIGISIAGLTADAR (No match)
	83 - 89	953.4811	952.4738	952.4623	12	0 LLCNFMR (No match)
	83 - 89	953.5100	952.5027	952.4623	42	0 LLCNFMR (Ions score 46, e-value 0.0033)
	97 - 107	1332.7590	1331.7517	1331.7349	13	0 FVFDRPLPVS (No match)
	97 - 107	1332.7900	1331.7827	1331.7349	36	0 FVFDRPLPVS (Ions score 41, e-value 0.0058)
	108 - 115	816.5144	815.5071	815.5116	-5	0 LVSLIGSK (No match)
	175 - 189	1880.8509	1879.8436	1879.8266	9	0 HMSEFMECNLNLVK (No match)
	194 - 208	1685.9297	1684.9224	1684.8995	14	1 ALRETLPAEQDLTTK (No match)
	209 - 217	886.5320	885.5247	885.5283	-4	0 NVSIGIVGK (No match)
	218 - 243	3126.4768	3125.4695	3125.4828	-4	1 DLEFTIYDDDDVSPFLEGLEERPQRK (No match)



Spot # gil8922498 Mass: 30311 Score: 241 Expect: 9.3e-20 Queries matched and confirmed: 6

825 pyridoxine 5'-phosphate oxidase [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1047.50	1046.49	1046.48	0.01	109	116	0	FFTNFESR
1522.72	1521.71	1521.70	0.01	105	116	1	DGFRFFTNFESR
1891.87	1890.87	1890.86	0.01	149	163	0	LPEEEAECYFHSRPK
2019.96	2018.95	2018.95	0.00	148	163	1	KLPEEEAECYFHSRPK
2428.26	2427.25	2427.25	0.00	164	185	1	SSQIGAVVSHQSSVIPDREYLR
2713.28	2712.27	2712.26	0.01	235	258	1	GLPTGDSPLGPMTHRGEEDWLYER

No match to: 831.51, 870.54, 926.42, 987.61, 1025.51, 1104.58, 1110.62, 1126.63, 1163.63, 1255.73, 1267.68, 1315.67, 1354.73, 1405.83, 1427.73, 1427.73, 1459.70, 1562.83, 1586.70, 1586.77, 1648.84, 1674.84, 1783.94, 1832.88, 1906.00, 1969.00, 1976.00, 1976.01, 1992.07, 1998.00, 2056.10, 2131.11, 2131.12, 2234.09, 2255.08, 2263.11, 2343.24, 2487.22, 2629.31, 2781.34, 2853.42

Number of mass values searched: 52

Number of mass values matched: 11

Number of mass values no matched: 41

Spot # gil662841 Mass: 22313 Score: 104 Expect: 1.1e-05 Queries matched: 5

825 heat shock protein 27 [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
987.64	986.63	986.60	0.03	5	12	1	RVPFSLLR
1163.66	1162.65	1162.61	0.04	28	37	0	LFDQAFGLPR
1655.86	1654.85	1654.84	0.01	80	94	1	QLSSGVSEIRHTADR
1783.96	1782.95	1782.92	0.04	97	112	0	VSLDVNHFAPDELTVK
1906.03	1905.02	1904.98	0.04	172	188	0	LATQSNEITIPVTFESR

No match to: 1047.52, 1047.52, 1104.62, 1110.66, 1126.65, 1267.71, 1405.85, 1427.76,
1427.76, 1459.73, 1522.74, 1562.86, 1586.79, 1648.87, 1674.87, 1690.87, 1813.93,
1882.99, 1891.92, 1969.03, 1976.03, 1992.07, 1998.03, 2019.99, 2056.13, 2131.15,
2189.13, 2234.13, 2263.15, 2343.26, 2428.31, 2487.27, 2629.34, 2781.38, 2853.44

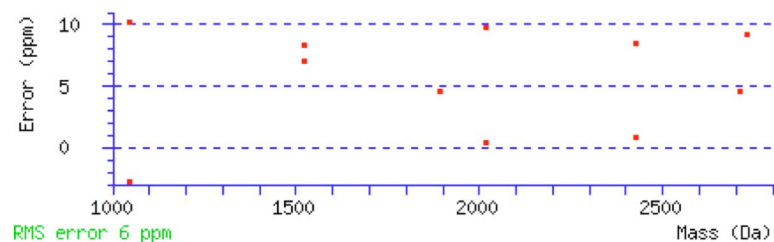
Number of mass values searched: 41

Number of mass values matched: 6

Number of mass values no matched: 35

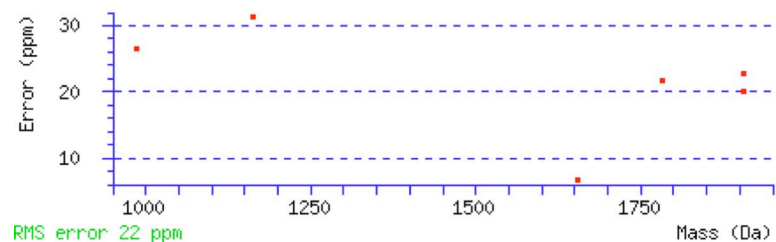
Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
825 pyridoxine 5'-phosphate oxidase	105 - 116	1522.7180	1521.7107	1521.7000	7	1 DGFRFFTNFESR (No match)
	109 - 116	1047.4865	1046.4792	1046.4821	-3	0 FFTNFESR (No match)
	109 - 116	1047.5000	1046.4927	1046.4821	10	0 FFTNFESR (Ions score 62, e-value 0.00011)
	148 - 163	2019.9600	2018.9527	2018.9519	0	1 KLPEEEAECYFHSRPK (Ions score 72, e-value 5.1e-0.6)
	148 - 163	2019.9788	2018.9715	2018.9519	10	1 KLPEEEAECYFHSRPK (No match)
	149 - 163	1891.8728	1890.8655	1890.8570	5	0 LPEEEAECYFHSRPK (No match)
	164 - 185	2428.2600	2427.2527	2427.2505	1	1 SSQIGAVVSHQSSVIPDREYLR (Ions score 42, e-value 0.006)
	164 - 185	2428.2784	2427.2711	2427.2505	8	1 SSQIGAVVSHQSSVIPDREYLR (No match)
	235 - 258	2713.2798	2712.2725	2712.2601	5	1 GLPTGDSPLGPMTHRGEEDWLYER (No match)



Spot #
825
heat shock protein 27

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
5 - 12	987.6358	986.6285	986.6025	26	1 RVPFSLLR (No match)
28 - 37	1163.6571	1162.6498	1162.6134	31	0 LFDQAFGLPR (No match)
80 - 94	1655.8568	1654.8495	1654.8386	7	1 QLSSGVSEIRHTADR (No match)
97 - 112	1783.9610	1782.9537	1782.9151	22	0 VSLDVNHFAPDELTVK (No match)
172 - 188	1906.0300	1905.0227	1904.9843	20	0 LATQSNEITIPVTFESR (Ions score 59)
172 - 188	1906.0350	1905.0277	1904.9843	23	0 LATQSNEITIPVTFESR (No match)



Mascot Search Results

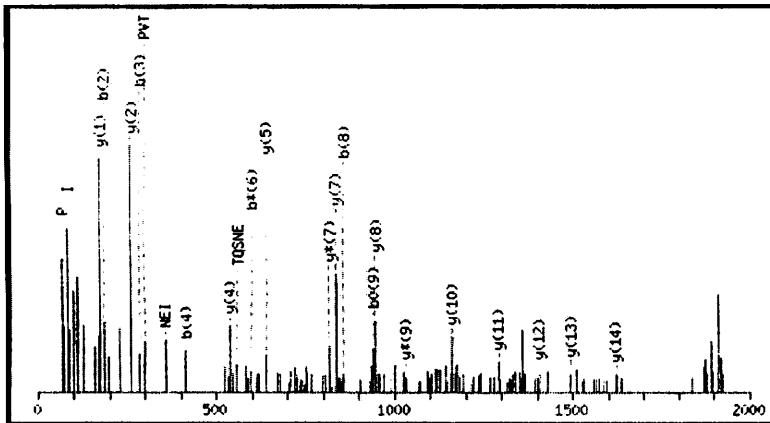
Peptide View

MS/MS Fragmentation of LATQSNEITIPVTFESR
Found in gil662841, heat shock protein 27 [Homo sapiens]

Match to Query 24: 1905.022724 from(1906.030000,1+)
Title: mascot generic peaklist of file G:\Aline\SPS0270AC\A10_MSMS_1906.0300_4.t2d
Data file C:\Aline\Peaklist.ms and msms for spot 825.txt

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da

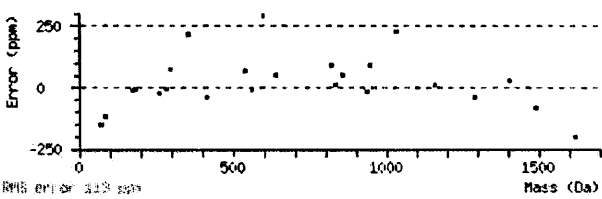
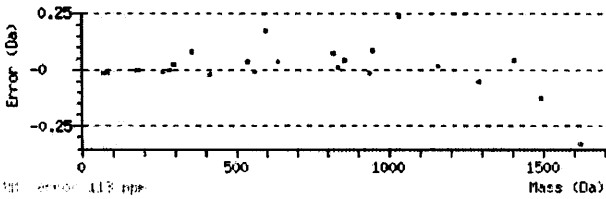


Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1904.9843
Ions Score: 59 Expect: 0.00031
Matches (Bold Red): 27/286 fragment ions using 60 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	y	y*	y ⁰	#
1	86.0964	86.0964			114.0913			L					17
2	44.0495	157.1335			185.1284			A	1776.8762	1792.9075	1775.8810	1774.8970	16
3	74.0600	258.1812		240.1707	286.1761		268.1656	T	1675.8286	1721.8704	1704.8439	1703.8599	15
4	101.0709	386.2398	369.2133	368.2292	414.2347	397.2082	396.2241	Q	1547.7700	1620.8228	1603.7962	1602.8122	14
5	60.0444	473.2718	456.2453	455.2613	501.2667	484.2402	483.2562	S	1460.7380	1492.7642	1475.7376	1474.7536	13
6	87.0553	587.3148	570.2882	569.3042	615.3097	598.2831	597.2991	N	1346.6950	1405.7321	1388.7056	1387.7216	12
7	102.0550	716.3573	699.3308	698.3468	744.3523	727.3257	726.3417	E	1217.6524	1291.6892	1274.6627	1273.6787	11
8	86.0964	829.4414	812.4149	811.4308	857.4363	840.4098	839.4258	I	1104.5684	1162.6466	1145.6201	1144.6361	10
9	74.0600	930.4891	913.4625	912.4785	958.4840	941.4575	940.4734	T	1003.5207	1049.5626	1032.5360	1031.5520	9
10	86.0964	1043.5731	1026.5466	1025.5626	1071.5681	1054.5415	1053.5575	I	890.4366	948.5149	931.4883	930.5043	8
11	70.0651	1140.6259	1123.5994	1122.6153	1168.6208	1151.5943	1150.6103	P	793.3839	835.4308	818.4043	817.4203	7
12	72.0808	1239.6943	1222.6678	1221.6838	1267.6892	1250.6627	1249.6787	V	694.3155	738.3781	721.3515	720.3675	6
13	74.0600	1340.7420	1323.7155	1322.7314	1368.7369	1351.7104	1350.7263	T	593.2678	639.3097	622.2831	621.2991	5
14	120.0808	1487.8104	1470.7839	1469.7998	1515.8053	1498.7788	1497.7948	F	446.1994	538.2620	521.2354	520.2514	4
15	102.0550	1616.8530	1599.8265	1598.8424	1644.8479	1627.8214	1626.8373	E	317.1568	391.1936	374.1670	373.1830	3
16	60.0444	1703.8850	1686.8585	1685.8745	1731.8799	1714.8534	1713.8694	S	230.1248	262.1510	245.1244	244.1404	2
17	129.1135							R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
AT	145.0972	173.0921	ATQ	273.1557	301.1506	ATQS	360.1878	388.1827
ATQSN	474.2307	502.2256	ATQSNE	603.2733	631.2682	TQ	202.1186	230.1135
TQS	289.1507	317.1456	TQSN	403.1936	431.1885	TQSNE	532.2362	560.2311
TQSNEI	645.3202	673.3151	QS	188.1030	216.0979	QSN	302.1459	330.1408
QSNE	431.1885	459.1834	QSNEI	544.2726	572.2675	QSNEIT	645.3202	673.3151
SN	174.0873	202.0822	SNE	303.1299	331.1248	SNEI	416.2140	444.2089
SNEIT	517.2617	545.2566	SNEITI	630.3457	658.3406	NE	216.0979	244.0928
NEI	329.1819	357.1769	NEIT	430.2296	458.2245	NEITI	543.3137	571.3086
NEITIP	640.3664	668.3614	EI	215.1390	243.1339	EIT	316.1867	344.1816
EITI	429.2708	457.2657	EITIP	526.3235	554.3184	EITIPV	625.3919	653.3868
IT	187.1441	215.1390	ITI	300.2282	328.2231	ITIP	397.2809	425.2758
ITIPV	496.3493	524.3442	ITIPVT	597.3970	625.3919	TI	187.1441	215.1390
TIP	284.1969	312.1918	TIPV	383.2653	411.2602	TIPVT	484.3130	512.3079
TIPVTF	631.3814	659.3763	IP	183.1492	211.1441	IPV	282.2176	310.2125
IPVT	383.2653	411.2602	IPVTF	530.3337	558.3286	IPVTFE	659.3763	687.3712

PV	169.1335	197.1284	PVT	270.1812	298.1761	PVTF	417.2496	445.2445
PVTFE	546.2922	574.2871	PVTFES	633.3242	661.3192	VT	173.1285	201.1234
VTF	320.1969	348.1918	VTFE	449.2395	477.2344	VTFES	536.2715	564.2664
TF	221.1285	249.1234	TFE	350.1710	378.1660	TFES	437.2031	465.1980
FE	249.1234	277.1183	FES	336.1554	364.1503	ES	189.0870	217.0819



NCBI BLAST search of LATQSN~~E~~ITPVTFESR
(Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Spot # gil7705885 Mass: 25694 Score: 129 Expect: 2.3e-07 Queries matched and confirmed: 9

874 vacuolar protein sorting 28 [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1399.71	1398.70	1398.69	0.02	36	47	0	YDNMAELFAVVK
1407.71	1406.70	1406.68	0.02	99	109	1	FRLDCPLAMER
1672.84	1671.83	1671.82	0.01	34	47	1	EKYDNMAELFAVVK + Oxidation (M)
1726.88	1725.87	1725.87	0.00	128	142	0	CIADVVSLEFVMDK + Oxidation (M)
1818.86	1817.85	1817.84	0.01	203	217	0	QMLFDLESAYNAFNR
1882.90	1881.89	1881.89	0.01	83	98	1	QVQGSEISSIDEFCRK
2077.94	2076.93	2076.92	0.00	55	72	1	AYIKDCVSPSEYTAACSR
2247.07	2246.06	2246.01	0.05	149	166	1	AMDEIQPDLRELMETMHR + 2 Oxidation (M)
2781.27	2780.26	2780.29	-0.03	178	202	0	QTVSQWLQTLSGMSASDELDDSQVR

No match to: 752.44, 871.58, 886.49, 886.51, 1198.72, 1267.70, 1337.74, 1405.72, 1427.74, 1459.71, 1524.79, 1531.84, 1535.79, 1551.80, 1562.82, 1586.77, 1648.84, 1655.82, 1701.91, 1737.79, 1831.92, 1842.92, 1847.92, 1865.87, 1941.98, 1957.98, 1967.92, 1976.00, 1998.00, 2020.93, 2056.10, 2094.02, 2125.17, 2131.12, 2255.07, 2487.17, 2515.11, 2532.12, 2582.34, 2694.24, 2706.21, 2853.36

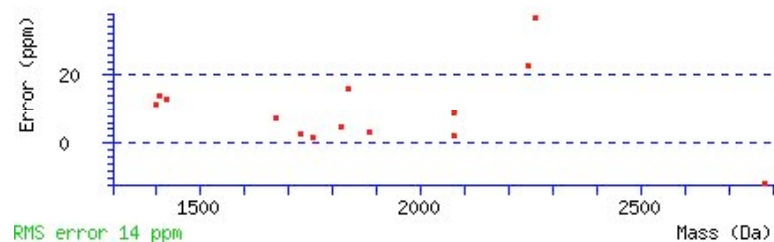
Number of mass values searched: 56

Number of mass values matched: 14

Number of mass values no matched: 42

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
874 vacuolar protein sorting 28	34 - 47	1672.8373	1671.8300	1671.8177	7	1 EKYDNMAELFAVVK Oxidation (M) (No match)
	36 - 47	1399.7083	1398.7010	1398.6853	11	0 YDNMAELFAVVK (No match)
	55 - 72	2077.9360	2076.9287	2076.9244	2	1 AYIKDCVSPSEYTAACSR (No match)
	55 - 72	2077.9500	2076.9427	2076.9244	9	1 AYIKDCVSPSEYTAACSR (Ions score 43, e-value 0.059)
	83 - 98	1882.9020	1881.8947	1881.8890	3	1 QVQGSEISSIDEFCRK (No match)
	99 - 109	1407.7072	1406.6999	1406.6798	14	1 FRLDCPLAMER (No match)
	128 - 142	1726.8802	1725.8729	1725.8681	3	0 CIADVVSFLFITVMDK Oxidation (M) (No match)
	149 - 166	2247.0717	2246.0644	2246.0129	23	1 AMDEIQPDLRELMETMHR 2 Oxidation (M) (No match)
	178 - 202	2781.2667	2780.2594	2780.2923	-12	0 QTVSQWLQTLSGMSASDELDDSQVR (No match)
	203 - 217	1818.8569	1817.8496	1817.8406	5	0 QMLFDLESAYNAFNR (No match)



MATRIX
SCIENCE

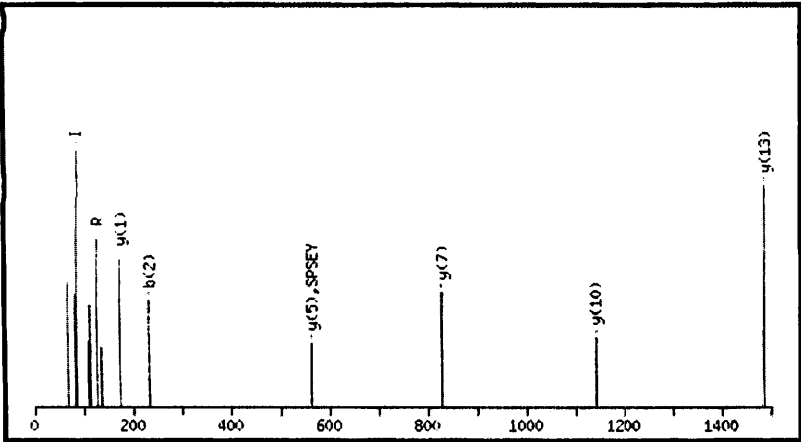
Mascot Search Results

Peptide View

MS/MS Fragmentation of AYIKDCVSPSEYTAACSR
Found in gil7705885, vacuolar protein sorting 28 isoform 1; yeast class E protein Vps28p homolog [Homo sapiens]
Match to Query 42: 2076.942724 from(2077.950000,1+)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from 0 to 1500 Da Full range

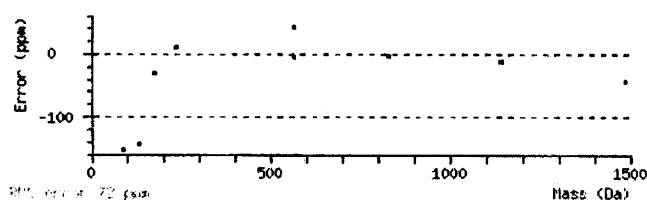
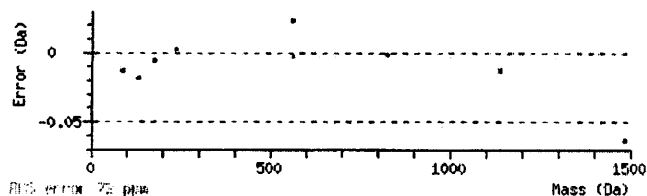


Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2076.9244
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Ions Score: 43 Expect: 0.059
Matches (Bold Red): 9/301 fragment ions using 8 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	y	y*	y ⁰	#
1	44.0495	44.0495			72.0444			A					18
2	136.0757	207.1128			235.1077			Y	1898.8371	2006.8946	1989.8681	1988.8841	17
3	86.0964	320.1969			348.1918			I	1785.7530	1843.8313	1826.8047	1825.8207	16
4	101.1073	448.2918	431.2653		476.2867	459.2602		K	1657.6581	1730.7472	1713.7207	1712.7367	15
5	88.0393	563.3188	546.2922	545.3082	591.3137	574.2871	573.3031	D	1542.6311	1602.6523	1585.6257	1584.6417	14
6	133.0430	723.3494	706.3229	705.3389	751.3443	734.3178	733.3338	C	1382.6005	1487.6253	1470.5988	1469.6148	13
7	72.0808	822.4178	805.3913	804.4073	850.4127	833.3862	832.4022	V	1283.5321	1327.5947	1310.5681	1309.5841	12
8	60.0444	909.4499	892.4233	891.4393	937.4448	920.4182	919.4342	S	1196.5000	1228.5263	1211.4997	1210.5157	11
9	70.0651	1006.5026	989.4761	988.4921	1034.4975	1017.4710	1016.4870	P	1099.4473	1141.4942	1124.4677	1123.4837	10
10	60.0444	1093.5346	1076.5081	1075.5241	1121.5296	1104.5030	1103.5190	S	1012.4153	1044.4415	1027.4149	1026.4309	9
11	102.0550	1222.5772	1205.5507	1204.5667	1250.5721	1233.5456	1232.5616	E	883.3727	957.4094	940.3829	939.3989	8
12	136.0757	1385.6406	1368.6140	1367.6300	1413.6355	1396.6089	1395.6249	Y	720.3093	828.3669	811.3403	810.3563	7
13	74.0600	1486.6882	1469.6617	1468.6777	1514.6832	1497.6566	1496.6726	T	619.2617	665.3035	648.2770	647.2930	6
14	44.0495	1557.7254	1540.6988	1539.7148	1585.7203	1568.6937	1567.7097	A	548.2245	564.2558	547.2293	546.2453	5
15	44.0495	1628.7625	1611.7359	1610.7519	1656.7574	1639.7308	1638.7468	A	477.1874	493.2187	476.1922	475.2082	4
16	133.0430	1788.7931	1771.7666	1770.7826	1816.7880	1799.7615	1798.7775	C	317.1568	422.1816	405.1551	404.1711	3
17	60.0444	1875.8251	1858.7986	1857.8146	1903.8201	1886.7935	1885.8095	S	230.1248	262.1510	245.1244	244.1404	2
18	129.1135							R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
YI	249.1598	277.1547	YIK	377.2547	405.2496	YIKD	492.2817	520.2766
YIKDC	652.3123	680.3072	IK	214.1914	242.1863	IKD	329.2183	357.2132
IKDC	489.2490	517.2439	IKDCV	588.3174	616.3123	IKDCVS	675.3494	703.3443
KD	216.1343	244.1292	KDC	376.1649	404.1598	KDCV	475.2333	503.2282
KDCVS	562.2654	590.2603	KDCVSP	659.3181	687.3130	DC	248.0700	276.0649
DCV	347.1384	375.1333	DCVS	434.1704	462.1653	DCVSP	531.2232	559.2181
DCVSPS	618.2552	646.2501	CV	232.1114	260.1063	CVS	319.1435	347.1384
CVSP	416.1962	444.1911	CVSPS	503.2282	531.2232	CVSPSE	632.2708	660.2657
VS	159.1128	187.1077	VSP	256.1656	284.1605	VSPS	343.1976	371.1925
VSPSE	472.2402	500.2351	VSPSEY	635.3035	663.2984	SP	157.0972	185.0921
SPS	244.1292	272.1241	SPSE	373.1718	401.1667	SPSEY	536.2351	564.2300
SPSEYT	637.2828	665.2777	PS	157.0972	185.0921	PSE	286.1397	314.1347

PSEY	449.2031	477.1980	PSEYT	550.2508	578.2457	PSEYTA	621.2879	649.2828
PSEYTAA	692.3250	720.3199	SE	189.0870	217.0819	SEY	352.1503	380.1452
SEYT	453.1980	481.1929	SEYTA	524.2351	552.2300	SEYTAA	595.2722	623.2671
EY	265.1183	293.1132	EYT	366.1660	394.1609	EYTA	437.2031	465.1980
EYTAA	508.2402	536.2351	EYTAAC	668.2708	696.2657	YT	237.1234	265.1183
YTA	308.1605	336.1554	YTAA	379.1976	407.1925	YTAAC	539.2282	567.2232
YTAACS	626.2603	654.2552	TA	145.0972	173.0921	TAA	216.1343	244.1292
TAAC	376.1649	404.1598	TAACS	463.1969	491.1919	AA	115.0866	143.0815
AAC	275.1172	303.1121	AACS	362.1493	390.1442	AC	204.0801	232.0750
ACS	291.1122	319.1071	CS	220.0750	248.0700			



NCBI BLAST search of AYIKDCVSPSEYTAACSR

(Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)

Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Spot # gil4757766 Mass: 50461 Score: 162 Expect: 7.4e-12 Queries matched and confirmed: 16
 4353 Rho GTPase activating protein 1; RhoGAP; p50rhoGAP; CDC42 GTPase-activating protein [Homo sapiens]

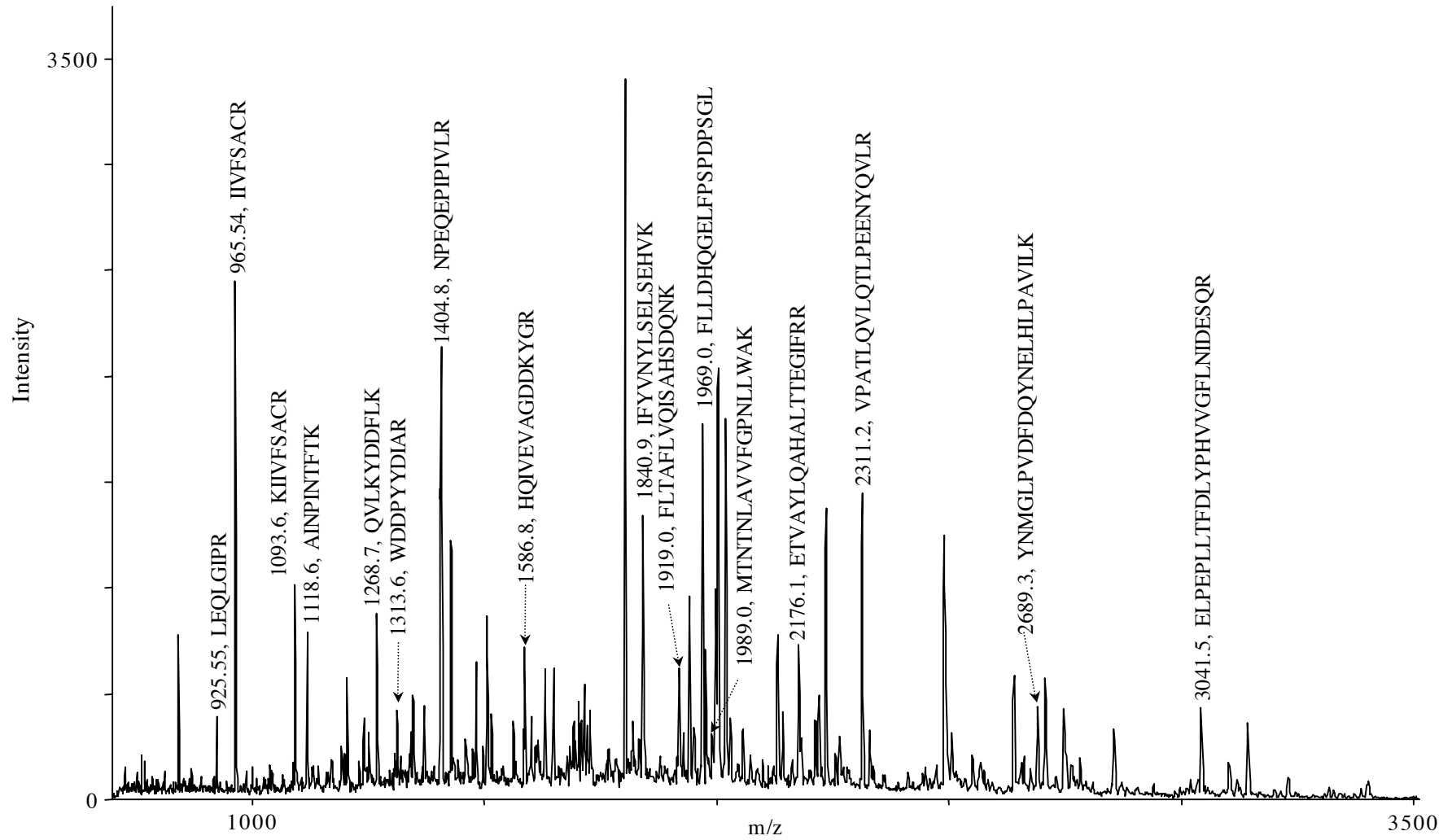
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
925.54	924.53	924.54	-0.01	201	208	0	LEQLGIPR
965.53	964.52	964.52	0.00	85	92	0	IIVFSACR
1093.62	1092.61	1092.61	0.00	84	92	1	KIIVFSACR
1118.62	1117.61	1117.61	0.00	412	421	0	AINPINTFTK
1268.70	1267.69	1267.68	0.01	209	218	1	QVLKYDDFLK
1313.58	1312.58	1312.57	0.00	60	69	0	WDDPYDIAR
1404.75	1403.74	1403.78	-0.03	253	264	0	NPEQEPIPIVLR
1586.79	1585.78	1585.78	-0.00	70	83	1	HQIVEVAGDDKYGR
1840.95	1839.94	1839.94	0.00	186	200	0	IFYVNYLSESEHVK
1919.00	1918.00	1917.99	0.00	370	386	0	FLTAFLVQISAHSDQNK
1968.97	1967.96	1967.96	-0.00	422	439	0	FLLDHQGELFSPDPSGL
1989.06	1988.05	1988.06	-0.00	387	404	0	MTNTNLAVVFGPNLLWAK
2176.15	2175.14	2175.14	-0.00	265	283	1	ETVAYLQAHALTTEGIFRR
2311.26	2310.26	2310.26	-0.00	350	369	0	VPATLQVLQTLPEENYQVLR
2689.33	2688.33	2688.36	-0.04	297	319	0	YNMGLPVDQYNELHLPVILK
3041.51	3040.51	3040.55	-0.05	324	349	0	ELPEPLLTFDLYPHVVGFLNIDESQR

No match to: 1205.66, 1240.63, 1251.66, 1347.66, 1370.71, 1406.70, 1427.73, 1474.73, 1482.80,
 1496.74, 1504.71, 1515.78, 1562.83, 1629.84, 1648.85, 1684.78, 1690.91, 1702.97, 1714.89, 1720.89,
 1726.87, 1801.94, 1927.00, 1940.93, 1976.00, 1996.98, 2001.99, 2028.96, 2056.16, 2131.11, 2142.06,
 2217.06, 2233.06, 2263.12, 2328.20, 2638.37, 2746.32, 2853.39

Number of mass values searched: 55

Number of mass values matched: 17 Number of mass values no matched: 38

MALDI-MS spectra for spot 4353



Spot # gil2119204 Mass: 53676 Score: 385 Expect: 5.8e-33 Queries matched and confirmed: 9

4920 vimentin - human

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1125.55	1124.54	1124.60	-0.05	114	122	1	FANYIDKVR
1295.70	1294.69	1294.66	0.03	391	401	0	MALDIEIATYR
1428.75	1427.74	1427.70	0.04	51	64	0	SLYASSPGGVYATR
1533.89	1532.88	1532.84	0.04	224	236	1	VESLQEEIAFLKK
1539.94	1538.94	1538.90	0.03	130	143	1	ILLAELEQLKGQ GK
1570.93	1569.92	1569.89	0.03	411	424	0	ISLPLPNFSSLNLR
1734.85	1733.84	1733.81	0.04	365	378	1	LQDEIQNMKEEMAR
1824.98	1823.97	1823.94	0.03	425	440	1	ETNLDSLPLVDTHSKR
2126.09	2125.08	2125.06	0.02	79	97	0	LLQDSVDFSLADAINTEFK

No match to: 1176.11, 1456.74, 1661.99, 1962.04, 2608.28

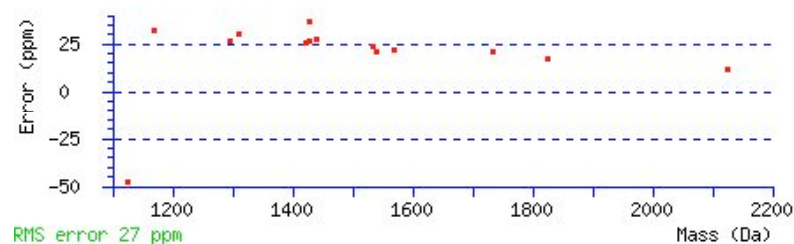
Number of mass values searched: 19

Number of mass values matched: 14

Number of mass values no matched: 5

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
4920	51 - 64	1428.7647	1427.7574	1427.7044	37	0 SLYASSPGGVYATR (No match)
Vimentin	79 - 97	2126.0900	2125.0827	2125.0578	12	0 LLQDSVDFSLADAINTEFK (Ions score 137, e-value 2.8e-11)
	114 - 122	1125.5516	1124.5443	1124.5978	-48	1 FANYIDKVR (No match)
	130 - 143	1539.9423	1538.9350	1538.9031	21	1 ILLAELEQLKGQ GK (No match)
	224 - 236	1533.8884	1532.8811	1532.8449	24	1 VESLQEEIAFLKK (No match)
	365 - 378	1734.8506	1733.8433	1733.8076	21	1 LQDEIQNMKEEMAR (No match)
	391 - 401	1295.7011	1294.6938	1294.6591	27	0 MALDIEIATYR (No match)
	411 - 424	1570.9300	1569.9227	1569.8878	22	0 ISLPLPNFSSLNLR (Ions score 89, e-value 1.3e-0.6)
	425 - 440	1824.9762	1823.9689	1823.9377	17	1 ETNLDLPLVDTHSKR (No match)



Spot # gill2654655 Mass: 33667 Score: 309 Expect: 2.3e-25 Queries matched and confirmed: 15

4965 NAPA protein [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1168.57	1167.56	1167.56	-0.00	107	116	0	AIEIYTDMGR
1389.75	1388.74	1388.75	-0.01	272	282	0	LDQWLTTMLLR
1417.65	1416.65	1416.65	-0.00	95	106	0	ADPQEAINCLMR
1453.76	1452.76	1452.76	-0.00	168	180	0	VAGYAALLEQYQK
1460.67	1459.66	1459.66	-0.00	228	239	0	YEELFPAFSDSR
1545.75	1544.74	1544.74	-0.00	94	106	1	KADPQEAINCLMR
1549.73	1548.72	1548.72	0.00	23	37	0	NSQSFFSGLFGGSSK
1623.73	1622.72	1622.71	0.00	79	93	0	HDAATCFVDAGNAFK
1663.76	1662.76	1662.77	-0.01	209	222	0	AALCHFCIDMLNAK
2000.00	1998.99	1999.01	-0.01	223	239	1	LAVQKYEELFPAFSDSR
2078.02	2077.01	2077.04	-0.03	181	199	0	AIDIYEQVGTNAMDSPLLK
2139.09	2138.08	2138.09	-0.01	123	140	0	HHISIAEIYETELVDIEK
2443.15	2442.14	2442.19	-0.05	57	78	0	NWSAAGNAFCQAAQLHLQLQSK
2562.12	2561.11	2561.13	-0.02	141	163	1	AIAHYEQSADYYKGEESSANK
2941.32	2940.31	2940.36	-0.05	247	271	1	LLEAHQEQNVDSYTESVKEYDSISR

No match to: 965.47, 1036.52, 1073.55, 1198.71, 1267.69, 1286.62, 1323.67, 1329.69, 1421.73, 1427.72, 1437.73, 1515.74, 1523.79, 1562.80, 1586.75, 1593.78, 1648.83, 1685.78, 1726.87, 1790.87, 1816.85, 1823.86, 1832.85, 1867.91, 1929.90, 1941.99, 1945.90, 1954.04, 1961.89, 2005.97, 2056.08, 2131.09, 2172.89, 2184.10, 2263.10, 2299.11, 2308.14, 2315.07, 2329.13, 2378.16, 2487.18, 2550.15, 2598.15, 2853.37, 2902.39

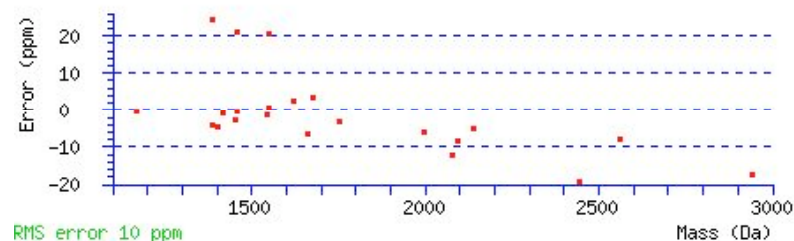
Number of mass values searched: 67

Number of mass values matched: 22

Number of mass values no matched: 45

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
4965 NAPA protein	23 - 37	1549.7292	1548.7219	1548.7208	1	0 NSQSFFSGLFGGSSK (No match)
	23 - 37	1549.7600	1548.7527	1548.7208	21	0 NSQSFFSGLFGGSSK (Ions score 74, e-value 7.7e-0.5)
	57 - 78	2443.1464	2442.1391	2442.1862	-19	0 NWSAAGNAFCQAAQLHLQLQSK (No match)
	79 - 93	1623.7262	1622.7189	1622.7147	3	0 HDAATCFVDAGNAFK (No match)
	94 - 106	1545.7490	1544.7417	1544.7439	-1	1 KADPQEAINCLMR (No match)
	95 - 106	1417.6550	1416.6477	1416.6489	-1	0 ADPQEAINCLMR (No match)
	107 - 116	1168.5663	1167.5590	1167.5594	-0	0 AIEIYTDMGR (No match)
	123 - 140	2139.0859	2138.0786	2138.0895	-5	0 HHISIAEIYETELVDIEK (No match)
	141 - 163	2562.1170	2561.1097	2561.1305	-8	1 AIAHYEQSADYYKGESNSSANK (No match)
	168 - 180	1453.7648	1452.7575	1452.7612	-3	0 VAGYAALLEQYQK (No match)
	181 - 199	2078.0217	2077.0144	2077.0401	-12	0 AIDIYEQVGTNAMDSPLLK (No match)
	209 - 222	1663.7642	1662.7569	1662.7680	-7	0 AALCHFCIDMLNAK (No match)
	223 - 239	2000.0002	1998.9929	1999.0050	-6	1 LAVQKYEELFPAFSDSR (No match)
	228 - 239	1460.6684	1459.6611	1459.6619	-1	0 YEELFPAFSDSR (No match)
	228 - 239	1460.7000	1459.6927	1459.6619	21	0 YEELFPAFSDSR (Ions score 40, e-value 0.21)
	247 - 271	2941.3192	2940.3119	2940.3624	-17	1 LLEAHEEQNVDSYTESVKEYDSISR (No match)
	272 - 282	1389.7500	1388.7427	1388.7486	-4	0 LDQWLTTMLLR (No match)
	272 - 282	1389.7900	1388.7827	1388.7486	25	0 LDQWLTTMLLR (Ions score 37, e-value 0.36)



Spot # gil4506217 Mass: 24697 Score: 157 Expect: 3.7e-10 Queries matched and confirmed: 6
 4966 proteasome 26S non-ATPase subunit 10

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
926.61	925.60	925.61	-0.01	214	222	1	GGLGLILKR
1142.64	1141.63	1141.63	-0.00	204	213	1	EKTPQLQVAK
1193.70	1192.69	1192.67	0.02	154	162	0	MIHILLYYK
1921.03	1920.02	1920.02	0.00	190	206	1	LLVSQGASIYIENKEEK
2035.05	2034.04	2034.03	0.01	117	135	1	NRHEIAVMLLEGGANPDAK
2471.23	2470.22	2470.10	0.12	163	184	0	ASTNIQDTEGNTPLHLACDEER

No match to: 785.39, 792.49, 803.40, 917.27, 948.60, 1043.53, 1134.63, 1163.62, 1231.68, 1267.69, 1318.73, 1324.68, 1427.73, 1427.76, 1459.70, 1506.77, 1562.83, 1586.76, 1648.83, 1692.89, 1726.83, 1783.92, 1816.87, 1832.92, 1976.00, 1997.99, 2056.09, 2072.09, 2090.94, 2131.11, 2172.12, 2201.06, 2234.10, 2240.09, 2256.06, 2263.10, 2295.21, 2308.14, 2487.22, 2497.18, 2658.47, 2706.22, 2853.40

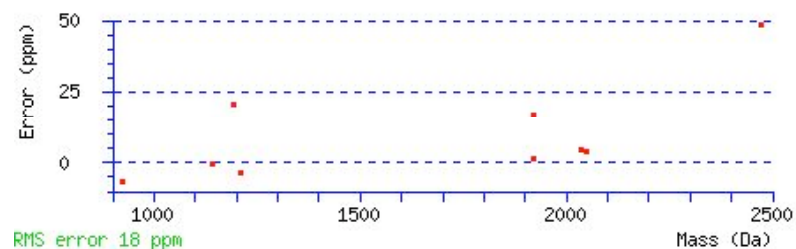
Number of mass values searched: 52

Number of mass values matched: 9

Number of mass values no matched: 43

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
4966	117 - 135	2035.0478	2034.0405	2034.0316	4	1 NRHEIAVMLLEGGANPDAK (No match)
	154 - 162	1193.7000	1192.6927	1192.6678	21	0 MIHILLYK (Ions score 65, e-value 0.00043)
	154 - 162	1209.6661	1208.6588	1208.6627	-3	0 MIHILLYK Oxidation (M) (No match)
	163 - 184	2471.2295	2470.2222	2470.1030	48	0 ASTNIQDTEGNTPLHLACDEER (No match)
	190 - 206	1921.0302	1920.0229	1920.0203	1	1 LLVSQGASIYIENKEEK (No match)
	190 - 206	1921.0600	1920.0527	1920.0203	17	1 LLVSQGASIYIENKEEK (Ions score 41, e-value 0.11)
	204 - 213	1142.6408	1141.6335	1141.6342	-1	1 EEKTPLQVAK (No match)
	214 - 222	926.6081	925.6008	925.6072	-7	1 GGLGLILKR (No match)



Spot # gil38566176 Mass: 28802 Score: 105 Expect: 5.7e-05 Queries matched and confirmed: 10

5087 Phosphoglycerate mutase [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1150.67	1149.66	1149.66	0.00	181	191	0	VLIAAHGNSLR
1177.65	1176.64	1176.71	-0.06	1	10	1	MAAYKLVLR
1306.78	1305.77	1305.76	0.01	180	191	1	RVLIAAHGNSLR
1998.02	1997.02	1997.06	-0.05	163	179	1	ALPFWNEEIVPQIKEGK
2115.10	2114.09	2114.12	-0.03	223	240	0	NLKPIKPMQFLGDEETVR
2135.95	2134.94	2134.97	-0.03	22	40	1	FSGWYDADLSPAGHEEAKR
2172.13	2171.12	2171.18	-0.06	66	83	0	TLWTVLDAIDQMWLLVVR
2243.19	2242.18	2242.21	-0.03	223	241	1	NLKPIKPMQFLGDEETVRK
2573.19	2572.18	2572.21	-0.02	117	138	1	RSYDVPPPPMEPDHPFYSNISK
2688.17	2687.16	2687.23	-0.07	118	140	1	SYDVPPPPMEPDHPFYSNISKDR

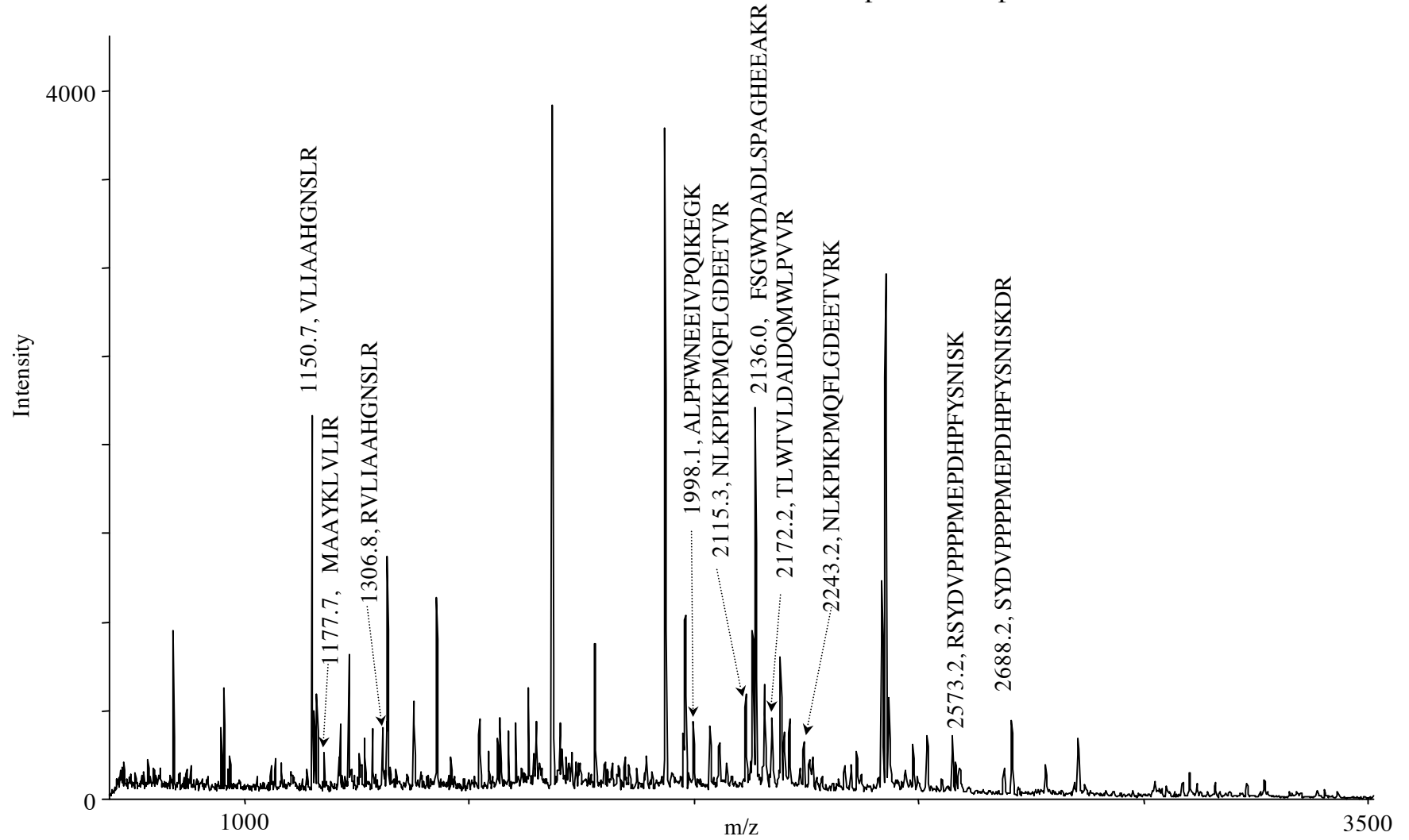
No match to: 948.54, 954.49, 968.46, 1058.59, 1068.49, 1082.58, 1156.61, 1160.61, 1231.68, 1255.73, 1267.68, 1285.72, 1318.74, 1324.68, 1337.53, 1376.75, 1391.70, 1427.72, 1459.69, 1466.83, 1522.84, 1542.86, 1562.82, 1568.88, 1586.75, 1602.87, 1643.81, 1648.84, 1655.82, 1701.91, 1705.87, 1721.85, 1726.87, 1779.79, 1799.88, 1807.95, 1816.88, 1829.91, 1832.88, 1844.88, 1855.83, 1893.98, 1935.88, 1979.02, 2035.13, 2056.07, 2156.14, 2192.03, 2199.13, 2234.07, 2263.10, 2334.13, 2348.18, 2362.12, 2425.14, 2487.16, 2518.18, 2581.23, 2706.22, 2853.37, 3266.49

Number of mass values searched: 76

Number of mass values matched: 15

Number of mass values no matched: 61

MALDI-MS spectra for spot 5087



Spot

gil4507171 Mass: 35465 Score: 80 Expect: 0.017 Queries matched and confirmed: 7

619 secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); Osteonectin
(secreted protein, acidic, cysteine-rich) [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calcd)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1215.61	1214.60	1214.61	-0.01	141	150	0	LHLDYIGPCK
1419.78	1418.78	1418.75	0.02	206	218	0	LEAGDHPVELLAR
1447.63	1446.63	1446.62	0.00	118	129	0	TFDSSCHFFATK
1575.86	1574.85	1574.85	0.00	205	218	1	RLEAGDHPVELLAR
1648.83	1647.82	1647.90	-0.08	169	181	1	DWLKNVLVTLYER
1949.95	1948.95	1948.96	-0.01	151	166	0	YIPPCLDSELTEFPLR
2278.15	2277.15	2277.15	-0.00	173	191	1	NVLVTLYERDEDNNLLTEK

No match to: 1170.67, 1199.68, 1199.70, 1209.68, 1227.64, 1267.71, 1284.75, 1298.77, 1314.77,
1348.67, 1410.71, 1414.70, 1427.72, 1459.70, 1470.80, 1512.76, 1528.74, 1547.80, 1562.83,
1570.89, 1586.76, 1655.90, 1692.84, 1699.87, 1727.88, 1740.94, 1783.99, 1799.98, 1815.89,
1832.86, 1858.89, 1875.91, 1884.00, 1890.95, 1934.01, 1975.99, 2056.09, 2072.09, 2131.09,
2164.99, 2202.12, 2202.14, 2268.13, 2340.11, 2396.22, 2412.27, 2487.25, 2500.26, 2514.33, 2540.36, 2556.34, 2632.31, 2641.37, 2769.46, 2909.36,
2941.40, 2980.46, 3093.54, 3221.70

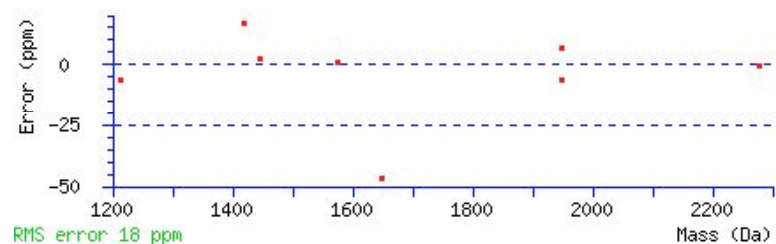
Number of mass values searched: 71

Number of mass values matched: 8

Number of mass values no matched: 63

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
619 Osteonectin	118 - 129	1447.6347	1446.6274	1446.6238	3	0 TFDSSCHFFATK (No match)
	141 - 150	1215.6110	1214.6037	1214.6117	-7	0 LLDYIGPCK (No match)
	151 - 166	1949.9548	1948.9475	1948.9604	-7	0 YIPPCLDSELTEFPLR (No match)
	151 - 166	1949.9800	1948.9727	1948.9604	6	0 YIPPCLDSELTEFPLR (Ions score 40, e-value 0.19)
	169 - 181	1648.8282	1647.8209	1647.8984	-47	1 DWLKNVLVTLYER (No match)
	173 - 191	2278.1545	2277.1472	2277.1488	-1	1 NVLVTLYERDEDNNLLTEK (No match)
	205 - 218	1575.8615	1574.8542	1574.8528	1	1 RLEAGDHPVELLAR (No match)
	206 - 218	1419.7823	1418.7750	1418.7517	16	0 LEAGDHPVELLAR (No match)



Mascot Search Results

Peptide View

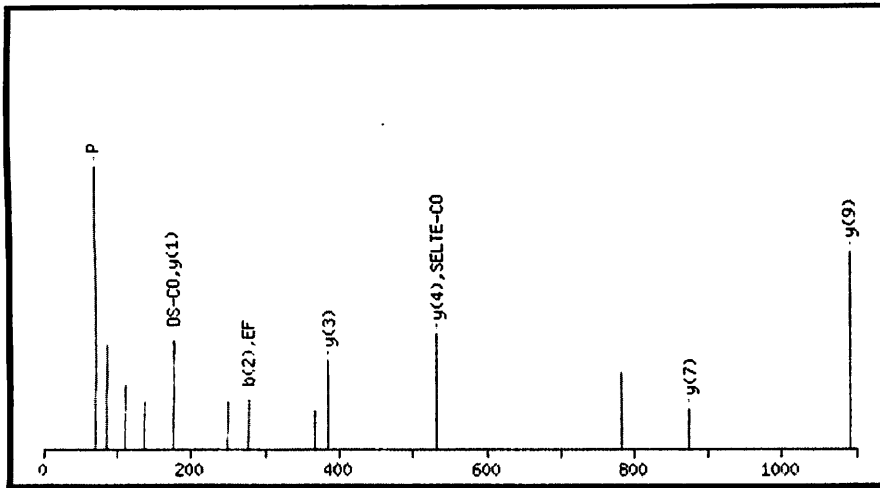
MS/MS Fragmentation of YIPCLDSELTEFPLR

Found in gil4507171, secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); Osteonectin (secreted protein, acidic, cysteine-rich) [Homo sapiens]

Match to Query 42: 1948.972724 from(1949.980000,1+)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1948.9604

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

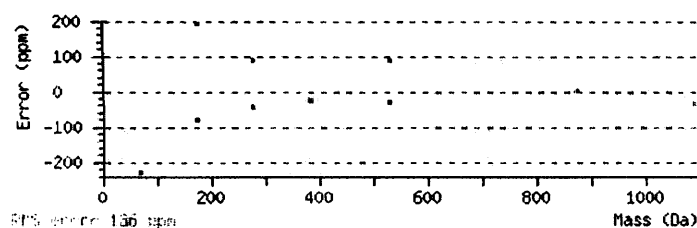
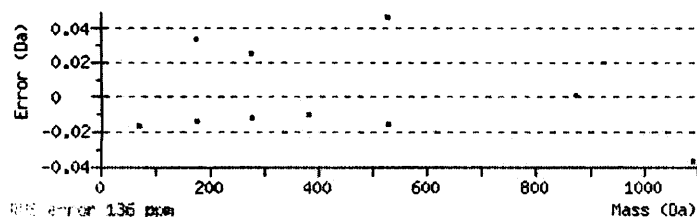
Ions Score: 40 Expect: 0.19

Matches (Bold Red): 12/225 fragment ions using 8 most intense peaks

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	v	y	y [*]	y ⁰	#
1	136.0757	136.0757		164.0706		Y					16
2	86.0964	249.1598		277.1547		I	1728.8261	1786.9044	1769.8778	1768.8938	15
3	70.0651	346.2125		374.2074		P	1631.7733	1673.8203	1656.7938	1655.8097	14
4	70.0651	443.2653		471.2602		P	1534.7206	1576.7675	1559.7410	1558.7570	13
5	133.0430	603.2959		631.2908		C	1374.6899	1479.7148	1462.6882	1461.7042	12
6	86.0964	716.3800		744.3749		L	1261.6059	1319.6841	1302.6576	1301.6736	11
7	88.0393	831.4069	813.3964	859.4018	841.3913	D	1146.5789	1206.6001	1189.5735	1188.5895	10
8	60.0444	918.4390	900.4284	946.4339	928.4233	S	1059.5469	1091.5731	1074.5466	1073.5626	9
9	102.0550	1047.4815	1029.4710	1075.4765	1057.4659	E	930.5043	1004.5411	987.5146	986.5305	8
10	86.0964	1160.5656	1142.5550	1188.5605	1170.5500	L	817.4203	875.4985	858.4720	857.4879	7
11	74.0600	1261.6133	1243.6027	1289.6082	1271.5976	T	716.3726	762.4144	745.3879	744.4039	6
12	102.0550	1390.6559	1372.6453	1418.6508	1400.6402	E	587.3300	661.3668	644.3402	643.3562	5
13	120.0808	1537.7243	1519.7137	1565.7192	1547.7086	F	440.2616	532.3242	515.2976		4
14	70.0651	1634.7770	1616.7665	1662.7720	1644.7614	P	343.2088	385.2558	368.2292		3
15	86.0964	1747.8611	1729.8505	1775.8560	1757.8455	L	230.1248	288.2030	271.1765		2
16	129.1135					R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
IP	183.1492	211.1441	IPP	280.2019	308.1969	IPPC	440.2326	468.2275
IPPCL	553.3167	581.3116	IPPCLD	668.3436	696.3385	PP	167.1179	195.1128
PPC	327.1485	355.1434	PPCL	440.2326	468.2275	PPCLD	555.2595	583.2544
PPCLDS	642.2916	670.2865	PC	230.0958	258.0907	PCL	343.1798	371.1747
PCLD	458.2068	486.2017	PCLDS	545.2388	573.2337	PCLDSE	674.2814	702.2763
CL	246.1271	274.1220	CLD	361.1540	389.1489	CLDS	448.1860	476.1810
CLDSE	577.2286	605.2235	CLDSEL	690.3127	718.3076	LD	201.1234	229.1183

LDS	288.1554	316.1503	LDSE	417.1980	445.1929	LDSEL	530.2820	558.2770
LDSELT	631.3297	659.3246	DS	175.0713	203.0662	DSE	304.1139	332.1088
DSEL	417.1980	445.1929	DSELT	518.2457	546.2406	DSELTE	647.2883	675.2832
SE	189.0870	217.0819	SEL	302.1710	330.1660	SELT	403.2187	431.2136
SELTE	532.2613	560.2562	SELTEF	679.3297	707.3246	EL	215.1390	243.1339
ELT	316.1867	344.1816	ELTE	445.2293	473.2242	ELTEF	592.2977	620.2926
ELTEFP	689.3505	717.3454	LT	187.1441	215.1390	LTE	316.1867	344.1816
LTEF	463.2551	491.2500	LTEFP	560.3079	588.3028	LTEFPPL	673.3919	701.3868
TE	203.1026	231.0975	TEF	350.1710	378.1660	TEFP	447.2238	475.2187
TEFPPL	560.3079	588.3028	EF	249.1234	277.1183	EFP	346.1761	374.1710
EFPL	459.2602	487.2551	FP	217.1335	245.1284	FPL	330.2176	358.2125
PL	183.1492	211.1441						



NCBI BLAST search of YIPPCLDSELTEFPLR
 (Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
 Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

B: Decreased intensity

Spot # gil4506179 Mass: 29822 Score: 315 Expect: 5.8e-26 Queries matched and confirmed: 12

5103 proteasome alpha 1 subunit

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
816.51	815.51	815.51	-0.00	108	115	0	LVSLIGSK
886.53	885.52	885.53	-0.00	209	217	0	NVSIQIVGK
953.48	952.47	952.46	0.01	83	89	0	LLCNFMR
1107.70	1106.69	1106.69	0.00	42	51	1	THAVLVALKR
1332.76	1331.75	1331.73	0.02	97	107	0	FVFDRPLPVS
1431.74	1430.73	1430.72	0.01	19	30	0	IHQIEYAMEAVK
1685.93	1684.92	1684.90	0.02	194	208	1	ALRETLPAEQDLTK
1778.83	1777.82	1777.80	0.02	4	18	0	NQYDNDVTWSPQGR
1880.85	1879.84	1879.83	0.02	175	189	0	HMSEFMECNLNELVK
2086.15	2085.14	2085.13	0.01	63	82	0	ILHVDNHIGISIAGLTADAR
2214.24	2213.24	2213.23	0.01	62	82	1	KILHVDNHIGISIAGLTADAR
2998.37	2997.36	2997.39	-0.03	218	242	0	DLEFTIYDDDDVSPFLEGLEERPQR

No match to: 862.46, 878.45, 896.45, 1062.64, 1231.70, 1267.71, 1354.74, 1370.71, 1386.69, 1427.74, 1453.74, 1459.72, 1529.89, 1582.82, 1586.78, 1609.85, 1648.86, 1726.89, 1771.92, 1775.04, 1935.91, 1976.03, 1979.05, 2056.10, 2131.13, 2348.21, 2415.19, 2487.22, 2549.19, 2648.25, 2664.33, 2706.22, 2853.39

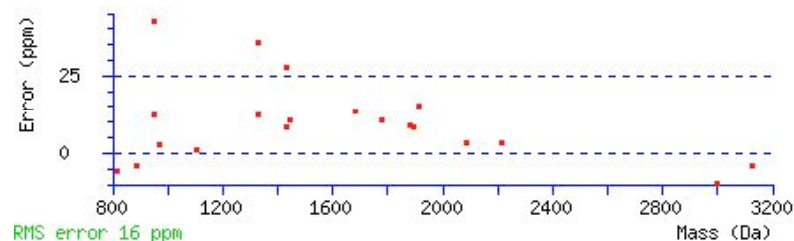
Number of mass values searched: 55

Number of mass values matched: 20

Number of mass values no matched: 33

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
5103 proteasome alpha 1 subunit	4 - 18	1778.8279	1777.8206	1777.8019	11	0 NQYDNDVTWSPQGR (No match)
	19 - 30	1431.7420	1430.7347	1430.7227	8	0 IHQIEYAMEAVK (No match)
	19 - 30	1431.7700	1430.7627	1430.7227	28	0 IHQIEYAMEAVK (Ions score 105, e-value 6.2e0.8)
	42 - 51	1107.7006	1106.6933	1106.6924	1	1 THAVLVALKR (No match)
	62 - 82	2214.2432	2213.2359	2213.2280	4	1 KILHVDNHIGISIAGLTADAR (No match)
	63 - 82	2086.1470	2085.1397	2085.1330	3	0 ILHVDNHIGISIAGLTADAR (No match)
	83 - 89	953.4811	952.4738	952.4623	12	0 LLCNFMR (No match)
	83 - 89	953.5100	952.5027	952.4623	42	0 LLCNFMR (Ions score 44, e-value 0.08)
	97 - 107	1332.7590	1331.7517	1331.7349	13	0 FVFDRLPLVSR (No match)
	108 - 115	816.5144	815.5071	815.5116	-5	0 LVSLIGSK (No match)
	175 - 189	1880.8509	1879.8436	1879.8266	9	0 HMSEFMECNLNLVK (No match)
	194 - 208	1685.9297	1684.9224	1684.8995	14	1 ALRETLPAEQDLTTK (No match)
	209 - 217	886.5320	885.5247	885.5283	-4	0 NVSIGIVGK (No match)
	218 - 242	2998.3655	2997.3582	2997.3879	-10	0 DLEFTIYDDDDVSPFLEGLEERPQR (No match)



Spot # gil4758112 Mass: 49416 Score: 126 Expect: 4.6e-07 Queries matched and confirmed: 10

442 HLA-B associated transcript 1; HLA-B associated transcript-1; DEAD-box protein;
nuclear RNA helicase (DEAD family) [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1103.66	1102.65	1102.65	-0.00	340	349	0	ILVATNLFGR
1137.67	1136.67	1136.66	0.01	145	155	0	VAVFFGGLSIK
1243.75	1242.74	1242.73	0.01	49	58	0	DFLLKPELLR
1296.68	1295.67	1295.63	0.04	37	48	0	GSYVSIHSSGFR
1306.68	1305.67	1305.66	0.01	164	175	0	NCPHIVVGTPGR
1462.81	1461.80	1461.80	0.00	257	268	0	LTLHGLQQYYVK
1998.00	1996.99	1996.94	0.05	217	233	1	MTPHEKQVMMFSATLSK + 2 Oxidation (M)
2193.01	2192.00	2192.01	-0.00	192	208	1	HFILDECCKMLEQLDMR
2277.24	2276.23	2276.25	-0.02	300	319	0	CIALAQLLVEQNFPAAIHR
2300.03	2299.02	2299.02	0.00	356	374	0	VNIAFNYPEDSDTYLHR

No match to: 1006.56, 1043.60, 1046.60, 1049.56, 1114.68, 1155.67, 1198.70, 1205.76, 1230.63, 1267.70, 1286.69, 1406.70, 1423.66, 1427.73, 1442.73, 1445.80, 1504.76, 1526.83, 1537.83, 1543.76, 1562.82, 1567.76, 1580.86, 1586.80, 1595.82, 1604.82, 1648.82, 1651.82, 1694.85, 1738.95, 1745.91, 1754.89, 1768.90, 1790.90, 1801.95, 1933.02, 1976.00, 2001.99, 2028.05, 2131.12, 2162.99, 2233.06, 2311.13, 2340.25, 2427.26, 2513.22, 2853.39

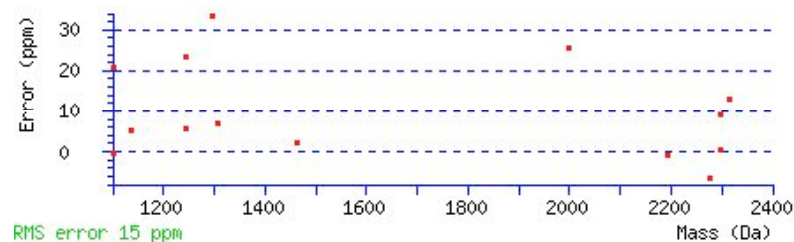
Number of mass values searched: 61

Number of mass values matched: 14

Number of mass values no matched: 47

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
442	37 - 48	1296.6763	1295.6690	1295.6258	33	0 GSYVSIHSSGFR (No match)
HLA-B associated transcript 1	49 - 58	1243.7476	1242.7403	1242.7336	5	0 DFLKPELLR (No match)
	145 - 155	1137.6726	1136.6653	1136.6593	5	0 VAVFFGGLSIK (No match)
	164 - 175	1306.6775	1305.6702	1305.6611	7	0 NCPHIVVGTPGR (No match)
	192 - 208	2193.0115	2192.0042	2192.0064	-1	1 HFILDECCKMLEQLDMR (No match)
	217 - 233	1998.0002	1996.9929	1996.9420	26	1 MTPHEKQVMMFSATLSK 2 Oxidation (M) (No match)
	257 - 268	1462.8085	1461.8012	1461.7979	2	0 LTLHGLQQYYVK (No match)
	300 - 319	2277.2384	2276.2311	2276.2463	-7	0 CIALAQLLVEQNFPALAIHR (No match)
	340 - 349	1103.6564	1102.6491	1102.6498	-1	0 ILVATNLFGR (No match)
	356 - 374	2300.0293	2299.0220	2299.0215	0	0 VNIAFNIDMPEDSDTYLHR (No match)
	356 - 374	2300.0500	2299.0427	2299.0215	9	0 VNIAFNIDMPEDSDTYLHR (Ions score 30, e-value 1.2)



Mascot Search Results

Peptide View

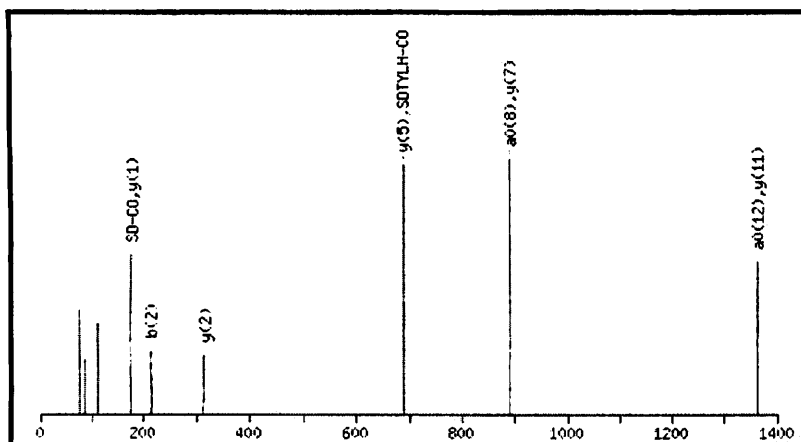
MS/MS Fragmentation of VNIAFNVDMPEDSDTYLHR

Found in gil4758112, HLA-B associated transcript 1; HLA-B associated transcript-1; DEAD-box protein; nuclear RNA helicase (DEAD family) [Homo sapiens]

Match to Query 55: 2299.042724 from(2300.050000,1+)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from 0 to 1400 Da Full range



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2299.0215

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

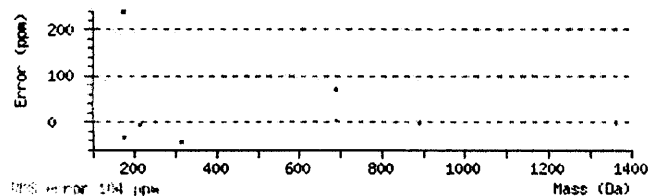
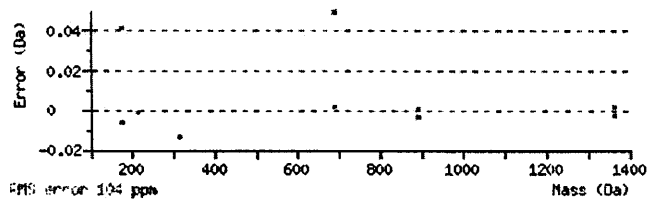
Ions Score: 30 Expect: 1.2

Matches (Bold Red): 11/307 fragment ions using 6 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	y	y*	y ⁰	#
1	72.0808	72.0808			100.0757			V					19
2	87.0553	186.1237	169.0972		214.1186	197.0921		N	2141.9233	2200.9604	2183.9338	2182.9498	18
3	86.0964	299.2078	282.1812		327.2027	310.1761		I	2028.8392	2086.9175	2069.8909	2068.9069	17
4	44.0495	370.2449	353.2183		398.2398	381.2132		A	1957.8021	1973.8334	1956.8069	1955.8228	16
5	120.0808	517.3133	500.2867		545.3082	528.2817		F	1810.7337	1902.7963	1885.7697	1884.7857	15
6	87.0553	631.3562	614.3297		659.3511	642.3246		N	1696.6908	1755.7279	1738.7013	1737.7173	14
7	136.0757	794.4195	777.3930		822.4145	805.3879		Y	1533.6274	1641.6849	1624.6584	1623.6744	13
8	88.0393	909.4465	892.4199	891.4359	937.4414	920.4149	919.4308	D	1418.6005	1478.6216	1461.5951	1460.6111	12
9	104.0529	1040.4870	1023.4604	1022.4764	1068.4819	1051.4553	1050.4713	M	1287.5600	1363.5947	1346.5681	1345.5841	11
10	70.0651	1137.5397	1120.5132	1119.5292	1165.5346	1148.5081	1147.5241	P	1190.5072	1232.5542	1215.5276	1214.5436	10
11	102.0550	1266.5823	1249.5558	1248.5718	1294.5772	1277.5507	1276.5667	E	1061.4646	1135.5014	1118.4749	1117.4909	9
12	88.0393	1381.6093	1364.5827	1363.5987	1409.6042	1392.5776	1391.5936	D	946.4377	1006.4588	989.4323	988.4483	8
13	60.0444	1468.6413	1451.6148	1450.6307	1496.6362	1479.6097	1478.6256	S	859.4057	891.4319	874.4054	873.4213	7
14	88.0393	1583.6682	1566.6417	1565.6577	1611.6631	1594.6366	1593.6526	D	744.3787	804.3999	787.3733	786.3893	6
15	74.0600	1684.7159	1667.6894	1666.7054	1712.7108	1695.6843	1694.7003	T	643.3311	689.3729	672.3464	671.3624	5
16	136.0757	1847.7792	1830.7527	1829.7687	1875.7742	1858.7476	1857.7636	Y	480.2677	588.3252	571.2987		4
17	86.0964	1960.8633	1943.8368	1942.8527	1988.8582	1971.8317	1970.8477	L	367.1837	425.2619	408.2354		3
18	110.0713	2097.9222	2080.8957	2079.9117	2125.9171	2108.8906	2107.9066	H	230.1248	312.1779	295.1513		2
19	129.1135							R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
NI	200.1394	228.1343	NIA	271.1765	299.1714	NIAF	418.2449	446.2398
NIAFN	532.2878	560.2827	NIAFNY	695.3511	723.3460	IA	157.1335	185.1284
IAF	304.2019	332.1969	IAFN	418.2449	446.2398	IAFNY	581.3082	609.3031
IAFNVD	696.3351	724.3301	AF	191.1179	219.1128	AFN	305.1608	333.1557
AFNY	468.2241	496.2191	AFNYD	583.2511	611.2460	FN	234.1237	262.1186
FNY	397.1870	425.1819	FNYD	512.2140	540.2089	FNYDM	643.2545	671.2494
NY	250.1186	278.1135	NYD	365.1456	393.1405	NYDM	496.1861	524.1810
NYDMP	593.2388	621.2337	YD	251.1026	279.0975	YDM	382.1431	410.1380
YDMP	479.1959	507.1908	YDMP	608.2385	636.2334	DM	219.0798	247.0747
DMP	316.1326	344.1275	DMPE	445.1751	473.1701	DMPED	560.2021	588.1970

DMPEDS	647.2341	675.2290	MP	201.1056	229.1005	MPE	330.1482	358.1431
MPED	445.1751	473.1701	MPEDS	532.2072	560.2021	MPEDSD	647.2341	675.2290
PE	199.1077	227.1026	PED	314.1347	342.1296	PEDS	401.1667	429.1616
PEDSD	516.1936	544.1885	PEDSDT	617.2413	645.2362	ED	217.0819	245.0768
EDS	304.1139	332.1088	EDSD	419.1409	447.1358	EDSDT	520.1885	548.1835
EDSDTY	683.2519	711.2468	DS	175.0713	203.0662	DSD	290.0983	318.0932
DSDT	391.1460	419.1409	DSDTY	554.2093	582.2042	DSDTYL	667.2933	695.2883
SD	175.0713	203.0662	SDT	276.1190	304.1139	SDTY	439.1823	467.1773
SDTYL	552.2664	580.2613	SDTYLH	689.3253	717.3202	DT	189.0870	217.0819
DTY	352.1503	380.1452	DTYL	465.2344	493.2293	DTYLH	602.2933	630.2882
TY	237.1234	265.1183	TYL	350.2074	378.2023	TYLH	487.2663	515.2613
YL	249.1598	277.1547	YLH	386.2187	414.2136	LH	223.1553	251.1502



NCBI BLAST search of VNIAFNYPEDSDTYLHR
 (Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
 Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Spot # gil4758112 Mass: 48960 Score: 333 Expect: 9.2e-28 Queries matched and confirmed: 11

455 HLA-B associated transcript 1; HLA-B associated transcript-1; DEAD-box protein;
nuclear RNA helicase (DEAD family) [Homo sapiens]

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
906.51	905.51	905.46	0.04	210	216	0	DVQEIFR
1035.54	1034.53	1034.49	0.04	201	208	0	MLEQLDMR
1103.70	1102.69	1102.65	0.04	340	349	0	ILVATNLFGR
1137.71	1136.70	1136.66	0.04	145	155	0	VAVFFGGLSIK
1243.79	1242.78	1242.73	0.04	49	58	0	DFLKPELLR
1259.80	1258.79	1258.75	0.04	339	349	1	RILVATNLFGR
1296.68	1295.67	1295.63	0.04	37	48	0	GSYVSIHSSGFR
1462.85	1461.84	1461.80	0.04	257	268	0	LTLLHGLQQYYVK
2300.08	2299.07	2299.02	0.05	356	374	0	VNIAFNYPEDSDTYLHR
2597.31	2596.30	2596.25	0.05	407	428	0	FEVNISELPDEIDISSYIEQTR
3288.67	3287.67	3287.59	0.08	242	268	1	FMQDPMEIFVDDTKLTLLHGLQQYYVK

No match to: 728.58, 772.61, 816.65, 842.55, 860.67, 881.31, 896.48, 963.57, 1277.75, 1306.71, 1475.81,
1994.03, 2131.16, 2163.06, 2193.07, 2209.06, 2260.28, 2277.29, 2703.30, 3081.46, 3097.65, 3102.49, 3117.53,
3130.59, 3228.48, 3263.63, 3337.71, 3454.71

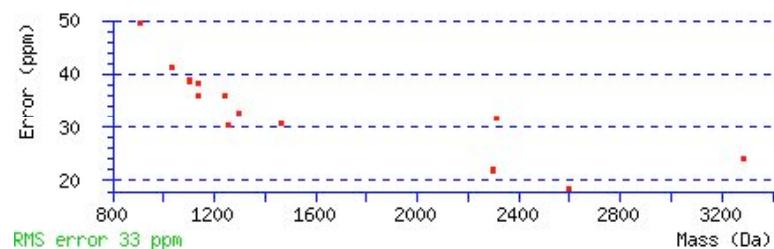
Number of mass values searched: 44

Number of mass values matched: 16

Number of mass values no matched: 28

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
455	37 - 48	1296.6755	1295.6682	1295.6258	33	0 GSYVSIHSSGFR (No match)
HLA-B associated transcript 1	49 - 58	1243.7855	1242.7782	1242.7336	36	0 DFLKPELLR (No match)
	145 - 155	1137.7076	1136.7003	1136.6593	36	0 VAVFFGGLSIK (No match)
	145 - 155	1137.7100	1136.7027	1136.6593	38	0 VAVFFGGLSIK (Ions score 76, e-value 1.5e-0.5)
	201 - 208	1035.5389	1034.5316	1034.4889	41	0 MLEQLDMR (No match)
	210 - 216	906.5128	905.5055	905.4606	50	0 DVQEIFR (No match)
	242 - 268	3288.6746	3287.6673	3287.5882	24	1 FMQDPMEIFVDDETKLTLHGLQQYYVK (No match)
	257 - 268	1462.8500	1461.8427	1461.7979	31	0 LTLHGLQQYYVK (Ions score 58, e-value 0.002)
	257 - 268	1462.8501	1461.8428	1461.7979	31	0 LTLHGLQQYYVK (No match)
	339 - 349	1259.7966	1258.7893	1258.7509	31	1 RILVATNLFGR (No match)
	340 - 349	1103.6996	1102.6923	1102.6498	39	0 ILVATNLFGR (No match)
	340 - 349	1103.7000	1102.6927	1102.6498	39	0 ILVATNLFGR (Ions score 42, e-value 0.039)
	356 - 374	2300.0789	2299.0716	2299.0215	22	0 VNIAFNYPEDSDTYLHR (No match)
	356 - 374	2300.0800	2299.0727	2299.0215	22	0 VNIAFNYPEDSDTYLHR (Ions score 67, e-value 0.00028)
	407 - 428	2597.3096	2596.3023	2596.2544	18	0 FEVNISELPDEIDISSYIEQTR (No match)



Spot # gil3892017 Mass: 51635 Score: 379 Expect: 2.3e-32 Queries matched and confirmed: 17
 5156 Chain A, Ribonuclease Inhibitor-Angiogenin Complex

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1209.71	1208.70	1208.69	0.01	53	63	0	VNPALAE LNLR
1477.77	1476.77	1476.74	0.02	259	270	0	TLWIWECGITAK
1513.80	1512.79	1512.77	0.02	359	372	0	ELCQGLGQPGSVLR
1630.84	1629.83	1629.80	0.04	173	187	0	ELTVSNNDINEAGVR
1853.02	1852.02	1852.00	0.01	19	33	0	WAELLPLLQQCQVVR
1988.02	1987.02	1986.99	0.03	283	301	1	ESLKELSLAGNELGDEGAR
2009.02	2008.01	2007.99	0.03	238	256	0	LGDVGM AELCPGLLHPSSR
2087.14	2086.14	2086.12	0.02	341	358	1	FLLELQISNNRLEDAGVR
2267.11	2266.10	2266.09	0.01	89	109	0	LSLQNCCLTGAGCGVLSSTLR
2288.05	2287.04	2287.16	-0.11	302	320	0	LLCETLLEPGCQLESLWVK
2290.01	2289.00	2288.97	0.03	321	340	0	SCSFTAACCSHFSSVLAQNR
2317.19	2316.19	2316.17	0.02	167	187	1	AKPDFKELTVSNNDINEAGVR
2367.17	2366.17	2366.16	0.00	146	166	0	LQLEYCSLSAASCEPLASVLR
2398.18	2397.17	2397.14	0.03	64	85	0	SNELGDVG VHCVLQGLQTPSCK
2415.24	2414.23	2414.21	0.02	401	422	0	ELDLSNNCLGDAGILQLVESVR
2539.15	2538.14	2538.11	0.03	195	216	1	DSPCQLEALKLESCGVTSDNCR
3061.46	3060.45	3060.46	-0.01	373	400	0	VLWLADCDVSDSSCSLAATLLANHSLR

No match to: 967.51, 969.50, 1032.52, 1054.64, 1110.59, 1125.62, 1152.64, 1196.59, 1295.68, 1427.75, 1445.72, 1539.93, 1570.91, 1648.85, 1661.96, 1710.89, 1734.84, 1824.96, 1868.02, 1932.87, 1949.95, 1973.08, 1977.00, 1982.96, 2020.95, 2134.01, 2187.14, 2518.23, 2686.28, 2913.33, 3014.45, 3337.54

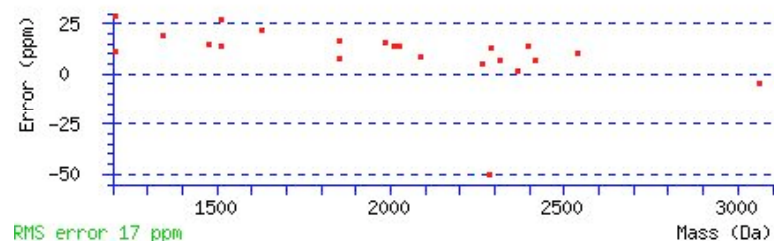
Number of mass values searched: 54

Number of mass values matched: 22

Number of mass values no matched: 32

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5156 ribonuclease/angiogenin inhibitor	20 - 34	1853.0249	1852.0176	1852.0029	8	0	WAE LLPLLQQCQVVR (No match)
	20 - 34	1853.0400	1852.0327	1852.0029	16	0	WAE LLPLLQQCQVVR (Ions score 57, e-value 0.0023)
	54 - 64	1209.7081	1208.7008	1208.6877	11	0	VNPALAE LNLR (No match)
	54 - 64	1209.7300	1208.7227	1208.6877	29	0	VNPALAE LNLR (Ions score 74, e-value 3.2e-0.5)
	65 - 86	2398.1809	2397.1736	2397.1416	13	0	SNELGDVG VHCVLQGLQTPSCK (No match)
	90 - 110	2267.1057	2266.0984	2266.0867	5	0	LSLQNCCLTGAGCGVLSSTLR (No match)
	147 - 167	2367.1724	2366.1651	2366.1609	2	0	LQLEYCSLSAASCEPLASVLR (No match)
	168 - 188	2317.1932	2316.1859	2316.1709	6	1	AKPDFKELTVSNNDINEAGVR (No match)
	174 - 188	1630.8385	1629.8312	1629.7957	22	0	ELTVSNNDINEAGVR (No match)
	196 - 217	2539.1486	2538.1413	2538.1148	10	1	DSPCQLEALKLESCGVTS DNCR (No match)
	239 - 257	2009.0221	2008.0148	2007.9870	14	0	LGDVGMAELCPGLLHPSSR (No match)
	260 - 271	1477.7726	1476.7653	1476.7435	15	0	TLWIWECGITAK (No match)
	284 - 302	1988.0239	1987.0166	1986.9857	16	1	ESLKELSLAGNELGDEGAR (No match)
	303 - 321	2288.0518	2287.0445	2287.1592	-50	0	LLCETLLEPGCQLESLWVK (No match)
	322 - 341	2290.0097	2289.0024	2288.9725	13	0	SCSFTAACCSHFSSVLAQNR (No match)
	342 - 359	2087.1423	2086.1350	2086.1170	9	1	FLLELQISNNRLEDAGVR (No match)
	360 - 373	1513.8001	1512.7928	1512.7718	14	0	ELCQGLGQPGSVLR (No match)
	360 - 373	1513.8200	1512.8127	1512.7718	27	0	ELCQGLGQPGSVLR (Ions score 57, e-value 0.0041)
	374 - 401	3061.4573	3060.4500	3060.4644	-5	0	VLWLADCDVSDSSCSLAATLLANHSLR (No match)
	402 - 423	2415.2351	2414.2278	2414.2110	7	0	ELDLSNNCLGDAGILQLVESVR (No match)



Spot # gil1085373 Mass: 57043 Score: 151 Expect: 1.5e-09 Queries matched and confirmed: 14

5187b protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) ER60 precursor - human

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
877.50	876.49	876.48	0.01	297	304	0	LNFAVASR
938.65	937.64	937.63	0.01	74	82	1	LKGIVPLAK
1084.58	1083.57	1083.56	0.01	95	104	0	YGVSGYPTLK
1172.55	1171.55	1171.53	0.01	336	344	0	FVMQEEFSR
1341.70	1340.69	1340.68	0.02	449	460	0	GFPTIYFSPANK
1370.71	1369.71	1369.69	0.02	472	482	0	ELSDFISYLQR
1427.75	1426.75	1426.70	0.05	215	226	1	FEDKTVAYTEPK
1469.79	1468.79	1468.77	0.01	449	461	1	GFPTIYFSPANKK
1515.78	1514.77	1514.75	0.02	352	363	1	FLQDYFDGNLKR
1619.81	1618.81	1618.78	0.03	259	271	0	DLIIAYYDVDYEK
1645.90	1644.89	1644.87	0.02	290	304	1	FLDAGHKLNFAVASR
1664.78	1663.77	1663.75	0.02	434	448	0	MDATANDVPSPYEV
2575.29	2574.28	2574.30	-0.02	306	329	0	TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR
2938.36	2937.35	2937.37	-0.02	148	173	1	FISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK

No match to: 811.55, 914.48, 951.50, 1054.64, 1112.64, 1136.62, 1142.60, 1147.64, 1150.77, 1157.58, 1214.69, 1220.71, 1220.73, 1231.61, 1236.70, 1242.69, 1249.61, 1252.69, 1267.70, 1273.69, 1292.73, 1308.68, 1329.72, 1358.73, 1376.81, 1417.78, 1437.77, 1441.76, 1458.76, 1479.80, 1524.75, 1562.84, 1586.82, 1593.85, 1596.92, 1610.86, 1659.87, 1675.87, 1685.90, 1690.94, 1729.95, 1774.00, 1782.99, 1870.00, 1887.02, 1976.02, 1998.02, 2001.10, 2013.05, 2053.17, 2056.14, 2061.07, 2105.00, 2131.12, 2168.12, 2181.17, 2227.13, 2235.22, 2409.16, 2487.22, 2986.44

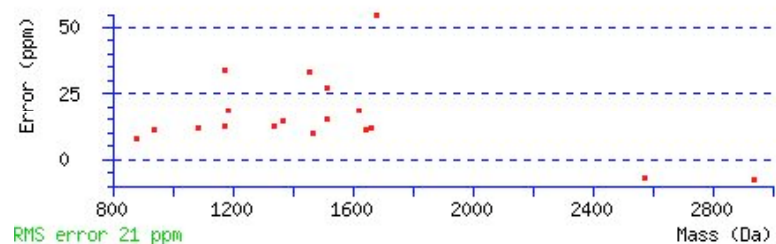
Number of mass values searched: 79

Number of mass values matched: 18

Number of mass values no matched: 61

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
5187b ER-60 protein	74 - 82	938.6502	937.6429	937.6324	11	1 LKGIVPLAK (No match)
	95 - 104	1084.5803	1083.5730	1083.5600	12	0 YGVSGYPTLK (No match)
	148 - 173	2938.3554	2937.3481	2937.3708	-8	1 FISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK (No match)
	215 - 226	1458.7592	1457.7519	1457.7038	33	1 FEDKTVAYTEQK (No match)
	259 - 271	1619.8133	1618.8060	1618.7766	18	0 DLLIAYYDVDYEK (No match)
	290 - 304	1645.8986	1644.8913	1644.8735	11	1 FLDAGHKLNFAVASR (No match)
	297 - 304	877.4960	876.4887	876.4817	8	0 LNFAVASR (No match)
	306 - 329	2575.2862	2574.2789	2574.2965	-7	0 TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIR (No match)
	336 - 344	1172.5549	1171.5476	1171.5331	12	0 FVMQEEFSR (No match)
	352 - 363	1515.7816	1514.7743	1514.7517	15	1 FLQDYFDGNLKR (No match)
	352 - 363	1515.8000	1514.7927	1514.7517	27	1 FLQDYFDGNLKR (Ions score 47, e-value 0.038)
	434 - 448	1664.7785	1663.7712	1663.7511	12	0 MDATANDVPSPYEVR (No match)
	449 - 460	1341.7000	1340.6927	1340.6764	12	0 GFPTIYFSPANK (No match)
	449 - 461	1469.7932	1468.7859	1468.7714	10	1 GFPTIYFSPANKK (No match)
	472 - 482	1370.7146	1369.7073	1369.6877	14	0 ELSDFISYLQR (No match)



(MATRIX) **Mascot Search Results**

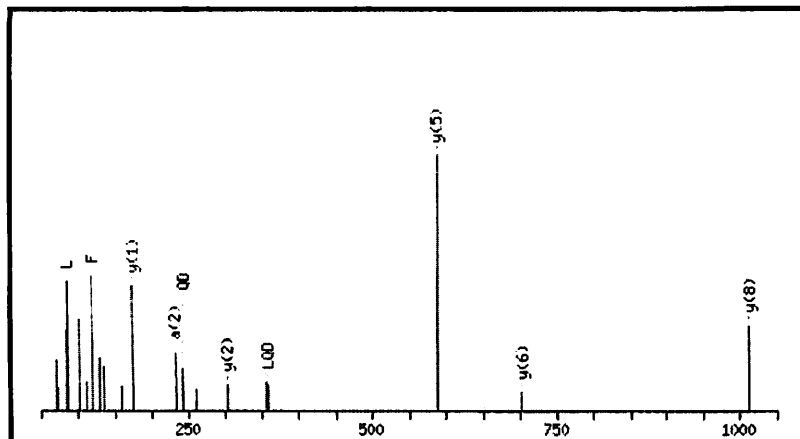
Peptide View

MS/MS Fragmentation of FLQDYFDGNLKR
Found in gil2245365, ER-60 protein [Homo sapiens]

Match to Query 42: 1514.792724 from(1515.800000,1+)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1514.7517

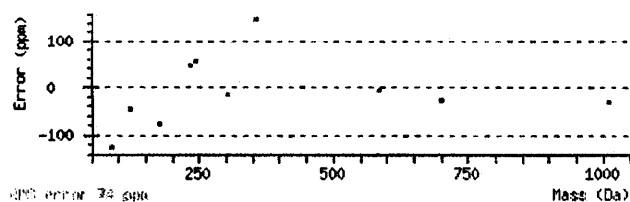
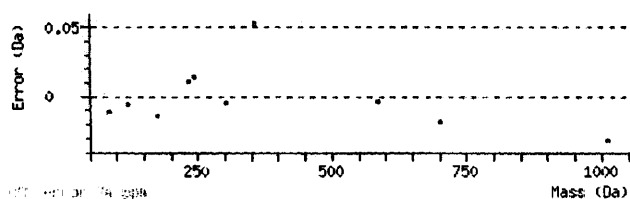
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 47 Expect: 0.038

Matches (Bold Red): 13/171 fragment ions using 10 most intense peaks

#	Immon.	a	a*	a ⁰	b	b*	b ⁰	Seq.	v	y	y*	y ⁰	#
1	120.0808	120.0808			148.0757			F					12
2	86.0964	233.1648			261.1597			L	1310.6124	1368.6906	1351.6641	1350.6801	11
3	101.0709	361.2234	344.1969		389.2183	372.1918		Q	1182.5538	1255.6066	1238.5800	1237.5960	10
4	88.0393	476.2504	459.2238	458.2398	504.2453	487.2187	486.2347	D	1067.5268	1127.5480	1110.5214	1109.5374	9
5	136.0757	639.3137	622.2871	621.3031	667.3086	650.2821	649.2980	Y	904.4635	1012.5210	995.4945	994.5105	8
6	120.0808	786.3821	769.3556	768.3715	814.3770	797.3505	796.3664	F	757.3951	849.4577	832.4312	831.4471	7
7	88.0393	901.4090	884.3825	883.3985	929.4039	912.3774	911.3934	D	642.3682	702.3893	685.3628	684.3787	6
8	30.0338	958.4305	941.4040	940.4199	986.4254	969.3989	968.4148	G		587.3624	570.3358		5
9	87.0553	1072.4734	1055.4469	1054.4629	1100.4683	1083.4418	1082.4578	N	471.3038	530.3409	513.3144		4
10	86.0964	1185.5575	1168.5309	1167.5469	1213.5524	1196.5259	1195.5418	L	358.2197	416.2980	399.2714		3
11	101.1073	1313.6524	1296.6259	1295.6419	1341.6474	1324.6208	1323.6368	K	230.1248	303.2139	286.1874		2
12	129.1135							R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
LQ	214.1550	242.1499	LQD	329.1819	357.1769	LQDY	492.2453	520.2402
LQDYF	639.3137	667.3086	QD	216.0979	244.0928	QDY	379.1612	407.1561
QDYF	526.2296	554.2245	QDYFD	641.2566	669.2515	QDYFDG	698.2780	726.2729
DY	251.1026	279.0975	DYF	398.1710	426.1660	DYFD	513.1980	541.1929
DYFDG	570.2194	598.2144	DYFDGN	684.2624	712.2573	YF	283.1441	311.1390
YFD	398.1710	426.1660	YFDG	455.1925	483.1874	YFDGN	569.2354	597.2303
YFDGNL	682.3195	710.3144	FD	235.1077	263.1026	FDG	292.1292	320.1241
FDGN	406.1721	434.1670	FDGNL	519.2562	547.2511	FDGNLK	647.3511	675.3460
DG	145.0608	173.0557	DGN	259.1037	287.0986	DGNL	372.1878	400.1827
DGNLK	500.2827	528.2776	GN	144.0768	172.0717	GNL	257.1608	285.1557
GNLK	385.2558	413.2507	NL	200.1394	228.1343	NLK	328.2343	356.2292
LK	214.1914	242.1863						



NCBI BLAST search of FLQDYFDGNLKR

(Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)

Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Spot # gil522193 Mass: 56792 Score: 327 Expect: 3.7e-27 Queries matched and confirmed: 23
 5187c vacuolar H+-ATPase 56,000 subunit

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
873.47	872.46	872.47	-0.01	30	37	0	EQALAVSR
877.47	876.46	876.45	0.01	38	44	0	NYLSQPR
1426.70	1425.69	1425.69	-0.00	109	120	1	KTSCEFTGDILR
1437.75	1436.74	1436.73	0.01	495	506	0	IPQSTLSEFYPR
1520.81	1519.80	1519.79	0.01	94	108	0	AVVQVFEGTSGIDAK
1593.85	1592.84	1592.83	0.01	494	506	1	RIPQSTLSEFYPR
1596.91	1595.90	1595.90	-0.00	387	400	0	QIYPPINVLPSLSR
1647.95	1646.94	1646.94	0.00	49	64	0	TVSGVNGPLVILDHVK
1690.92	1689.91	1689.91	0.01	472	485	0	TVFETLDIGWQLLR
1712.94	1711.93	1711.93	0.00	68	82	1	YAEIVHLTLPDGTKR
1757.88	1756.88	1756.87	0.01	277	291	0	LALTTAEFLAYQCEK
1896.89	1895.88	1895.88	0.00	322	337	0	GFPGYMYTDLATIYER
1918.02	1917.01	1917.00	0.01	292	308	0	HVLVILTDMSYAEALR
1924.90	1923.89	1923.88	0.02	414	430	0	DHADVSNQLYACYAIGK
2000.09	1999.09	1999.08	0.00	8	29	0	GIVNGAAPELPVPTGGPAVGAR
2052.99	2051.98	2051.98	0.01	321	337	1	RGFPGYMYTDLATIYER
2178.13	2177.13	2177.14	-0.01	189	208	0	IPIFSAAGLPHNEIAAQICR
2409.15	2408.15	2408.17	-0.02	164	185	0	IYPEEMIQTGISAIDGMNSIAR
2469.20	2468.19	2468.22	-0.03	142	163	0	GPVVLAEDFLDIMGQPINPQCR
2491.30	2490.29	2490.32	-0.03	186	208	1	GQKIPIFSAAGLPHNEIAAQICR
2785.37	2784.37	2784.42	-0.06	437	460	1	AVVGEEALTSDDLLYLEFLQKFER
2993.31	2992.30	2992.39	-0.09	216	242	1	SKDVVDYSEENFAIVFAAMGVNMETAR
3000.30	2999.29	2999.33	-0.04	246	271	0	SDFEENGSMNVCLFLNLANPTIER

No match to: 914.46, 1093.58, 1112.61, 1120.62, 1125.62, 1136.61, 1157.57, 1194.71, 1220.70, 1249.58, 1267.70, 1348.71, 1370.70, 1384.76, 1443.69, 1459.70, 1515.75, 1562.82, 1579.89, 1586.77, 1638.87, 1664.86, 1701.91, 1798.97, 1832.87, 1976.00, 2001.10, 2043.12, 2131.11, 2227.10, 2487.18, 2541.17, 2641.32, 2853.35, 2902.38, 3017.29, 3101.29, 3228.42, 3499.68

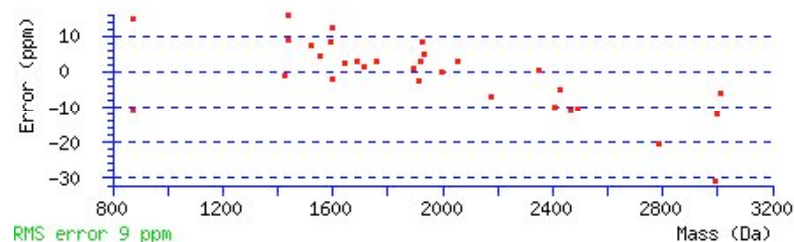
Number of mass values searched: 70

Number of mass values matched: 31

Number of mass values no matched: 39

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
5187c vacuolar H ⁺ -ATPase	8 - 29	2000.0924	1999.0851	1999.0849	0	0 GIVNGAAPELPVPTGGPAVGAR (No match)
	30 - 37	873.4691	872.4618	872.4715	-11	0 EQALAVSR (No match)
	38 - 44	877.4654	876.4581	876.4453	15	0 NYLSQPR (No match)
	49 - 64	1647.9463	1646.9390	1646.9355	2	0 TVSGVNGPLVILDHVK (No match)
	68 - 82	1712.9353	1711.9280	1711.9257	1	1 YAEIVHLTLPDGTKR (No match)
	94 - 108	1520.8068	1519.7995	1519.7881	7	0 AVVQVFEGTSGIDAK (No match)
	109 - 120	1426.6977	1425.6904	1425.6922	-1	1 KTSCEFTGDILR (No match)
	142 - 163	2469.1994	2468.1921	2468.2191	-11	0 GPVVLAEDFLDIMGQPINPQCR (No match)
	164 - 185	2409.1545	2408.1472	2408.1715	-10	0 IYPEEMIQTGISAIDGMNSIAR (No match)
	186 - 208	2491.2972	2490.2899	2490.3165	-11	1 GQKIPIFSAAGLPHNEIAAQICR (No match)
	189 - 208	2178.1340	2177.1267	2177.1415	-7	0 IPIFSAAGLPHNEIAAQICR (No match)
	216 - 242	2993.3091	2992.3018	2992.3945	-31	1 SKDVVDYSEENFAIVFAAMGVNMETAR (No match)
	246 - 271	3000.2987	2999.2914	2999.3276	-12	0 SDFEENGSMNDNVCLFLNLANDPTIER (No match)
	277 - 291	1757.8831	1756.8758	1756.8705	3	0 LALTAEFLAYQCEK (No match)
	292 - 308	1918.0155	1917.0082	1917.0029	3	0 HVLVILTDMSSYAEALR (No match)
	321 - 337	2052.9909	2051.9836	2051.9774	3	1 RGFPGYMYTDLATIIYER (No match)
	322 - 337	1896.8851	1895.8778	1895.8763	1	0 GFPGGYMYTDLATIIYER (No match)
	387 - 400	1596.9073	1595.9000	1595.9035	-2	0 QIYPPINVLPSLSR (No match)
	387 - 400	1596.9300	1595.9227	1595.9035	12	0 QIYPPINVLPSLSR (Ions score 40, e-value 0.097)
	414 - 430	1924.9020	1923.8947	1923.8784	8	0 DHADVSNQLYACYAIGK (No match)
	437 - 460	2785.3728	2784.3655	2784.4221	-20	1 AVVGEEALTSDDLLYLEFLQKFER (No match)
	472 - 485	1690.9214	1689.9141	1689.9090	3	0 TVFETLDIGWQLLR (No match)
	494 - 506	1593.8515	1592.8442	1592.8310	8	1 RIPQSTLSEFYPR (No match)
	495 - 506	1437.7498	1436.7425	1436.7299	9	0 IPQSTLSEFYPR (No match)
	495 - 506	1437.7600	1436.7527	1436.7299	16	0 IPQSTLSEFYPR (Ions score 35, e-value 0.59)



Spot # gil6137677 Mass: 54394 Score: 148 Expect: 2.9e-09 Queries matched and confirmed: 13

5194 Aldehyde Dehydrogenase

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1132.59	1131.58	1131.58	-0.00	62	71	0	AAFQLGSPWR
1177.65	1176.65	1176.65	-0.00	404	413	1	FKTIEEVVGR
1205.65	1204.64	1204.62	0.02	322	332	1	SRVVGNPFDSK
1342.79	1341.78	1341.77	0.01	246	258	1	VIQVAAGSSNLKR
1369.79	1368.78	1368.78	0.00	173	186	0	LGPALATGNVVVMK
1403.76	1402.75	1402.75	0.00	392	403	0	EEIFGPVMQILK
1458.69	1457.68	1457.67	0.01	125	136	1	YYAGWADKYHGK
1527.79	1526.78	1526.77	0.01	414	428	0	ANNSTYGLAAAVFTK
1531.75	1530.74	1530.74	0.01	137	149	0	TIPIDGDFFSYTR
1599.78	1598.78	1598.78	-0.01	470	483	0	ELGEYGLQAYTEVK
1789.83	1788.83	1788.82	0.01	302	315	0	TFVQEDIYDEFVER
1844.05	1843.04	1843.05	-0.01	187	203	0	VAEQTPLTALYVANLIK
2450.17	2449.16	2449.18	-0.01	324	345	1	VVGPNPFDSKTEQGPQVDETQFK

No match to: 881.27, 979.56, 1148.60, 1194.70, 1251.71, 1267.71, 1267.74, 1267.74, 1319.72, 1384.73, 1427.73, 1504.71, 1507.69, 1648.82, 1726.87, 1759.95, 1801.04, 1877.96, 1951.96, 1958.98, 1980.08, 1996.97, 2028.94, 2044.94, 2056.12, 2097.88, 2131.12, 2186.16, 2202.15, 2235.22, 2332.13, 2487.24, 2564.27, 2578.26, 2853.41, 2905.43, 2963.42

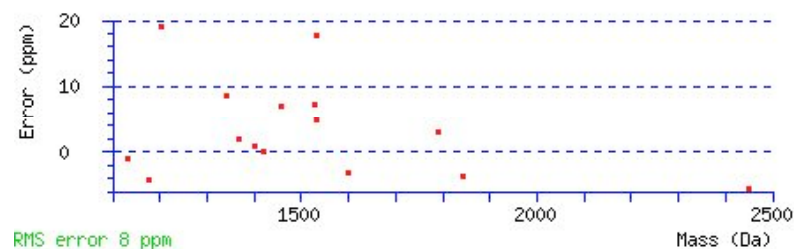
Number of mass values searched: 52

Number of mass values matched: 15

Number of mass values no matched: 37

Combination of peptide sequences from MALDI-MS/MS (in grey) and peptides from MALDI-MS (“No matched”) used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
5194	62 - 71	1132.5885	1131.5812	1131.5825	-1	0 AAFQLGSPWR (No match)
Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase	125 - 136	1458.6903	1457.6830	1457.6727	7	1 YYAGWADKYHGK (No match)
	137 - 149	1531.7502	1530.7429	1530.7354	5	0 TIPIDGDDFSYTR (No match)
	137 - 149	1531.7700	1530.7627	1530.7354	18	0 TIPIDGDDFSYTR (Ions score 43, e-value 0.1)
	173 - 186	1369.7899	1368.7826	1368.7798	2	0 LGPALATGNVVMK (No match)
	187 - 203	1844.0459	1843.0386	1843.0454	-4	0 VAEQTPLTALYVANLIK (No match)
	246 - 258	1342.7915	1341.7842	1341.7728	9	1 VIQVAAGSSNLKR (No match)
	302 - 315	1789.8334	1788.8261	1788.8206	3	0 TFVQEDIYDEFVER (No match)
	322 - 332	1205.6501	1204.6428	1204.6200	19	1 SRVVGNPFDISK (No match)
	324 - 345	2450.1694	2449.1621	2449.1760	-6	1 VVGNPFDISKTEQGPQVDETQFK (No match)
	392 - 403	1403.7614	1402.7541	1402.7530	1	0 EEIFGPVMQILK (No match)
	404 - 413	1177.6526	1176.6453	1176.6502	-4	1 FKTIIEVVGR (No match)
	414 - 428	1527.7914	1526.7841	1526.7728	7	0 ANNSTYGLAAVFTK (No match)
	470 - 483	1599.7848	1598.7775	1598.7827	-3	0 ELGEYGLQAYTEVK (No match)

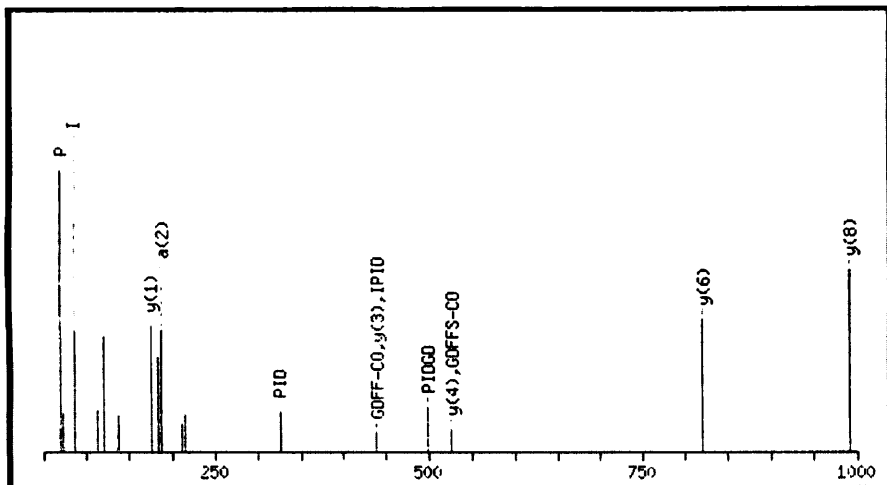


(MATRIX) Mascot Search Results
(SCIENCE)**Peptide View**MS/MS Fragmentation of **TIPIDGFFSYTR**

Found in gil6137677, Chain A, Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Complexed With Nad+ And Mn2+

Match to Query 24: 1530.762724 from(1531.770000,1+)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from to Da 

Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1530.7354

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

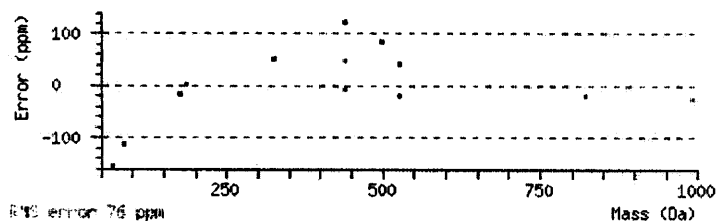
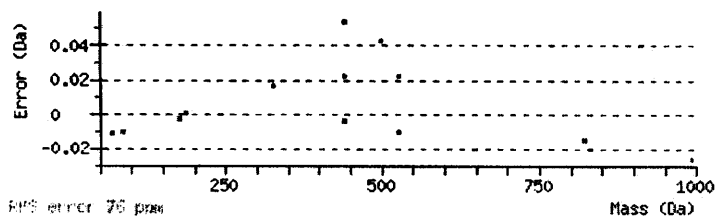
Ions Score: 43 Expect: 0.1

Matches (Bold Red): 14/184 fragment ions using 10 most intense peaks

#	Immon.	a	a ⁰	b	b ⁰	Seq.	v	y	y [*]	y ⁰	#
1	74.0600	74.0600	56.0495	102.0550	84.0444	T					13
2	86.0964	187.1441	169.1335	215.1390	197.1285	I	1372.6168	1430.6950	1413.6685	1412.6845	12
3	70.0651	284.1969	266.1863	312.1918	294.1812	P	1275.5640	1317.6110	1300.5844	1299.6004	11
4	86.0964	397.2809	379.2704	425.2758	407.2653	I	1162.4800	1220.5582	1203.5317	1202.5476	10
5	88.0393	512.3079	494.2973	540.3028	522.2922	D	1047.4530	1107.4741	1090.4476	1089.4636	9
6	30.0338	569.3293	551.3188	597.3242	579.3137	G		992.4472	975.4207	974.4366	8
7	88.0393	684.3563	666.3457	712.3512	694.3406	D	875.4046	935.4257	918.3992	917.4152	7
8	120.0808	831.4247	813.4141	859.4196	841.4090	F	728.3362	820.3988	803.3723	802.3882	6
9	120.0808	978.4931	960.4825	1006.4880	988.4774	F	581.2678	673.3304	656.3039	655.3198	5
10	60.0444	1065.5251	1047.5146	1093.5200	1075.5095	S	494.2358	526.2620	509.2354	508.2514	4
11	136.0757	1228.5884	1210.5779	1256.5834	1238.5728	Y	331.1724	439.2300	422.2034	421.2194	3
12	74.0600	1329.6361	1311.6256	1357.6310	1339.6205	T	230.1248	276.1666	259.1401	258.1561	2
13	129.1135					R	74.0236	175.1189	158.0924		1

Seq	ya	yb	Seq	ya	yb	Seq	ya	yb
IP	183.1492	211.1441	IPI	296.2332	324.2282	IPID	411.2602	439.2551
IPIDG	468.2816	496.2766	IPIDGD	583.3086	611.3035	PI	183.1492	211.1441
PID	298.1761	326.1710	PIDG	355.1976	383.1925	PIDGD	470.2245	498.2194
PIDGDF	617.2929	645.2878	ID	201.1234	229.1183	IDG	258.1448	286.1397
IDGD	373.1718	401.1667	IDGDF	520.2402	548.2351	IDGDFF	667.3086	695.3035
DG	145.0608	173.0557	DGD	260.0877	288.0826	DGDFF	407.1561	435.1510
DGDFF	554.2245	582.2194	DGDFFS	641.2566	669.2515	GD	145.0608	173.0557
GDF	292.1292	320.1241	GDF	439.1976	467.1925	GDDFFS	526.2296	554.2245
GDDFFSY	689.2929	717.2879	DF	235.1077	263.1026	DFF	382.1761	410.1710
DFFS	469.2082	497.2031	DFFSY	632.2715	660.2664	FF	267.1492	295.1441
FFS	354.1812	382.1761	FFSY	517.2445	545.2395	FFSYT	618.2922	646.2871

FS	207.1128	235.1077	FSY	370.1761	398.1710	FSYT	471.2238	499.2187
SY	223.1077	251.1026	SYT	324.1554	352.1503	YT	237.1234	265.1183



NCBI BLAST search of TIPIDGDFFSYTR
 (Parameters: blastp, nr protein database, expect=20000, no filter, PAM30)
 Other BLAST [web gateways](#)

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Table S.3: List of proteins identified with the MALDI-MS data or with the MALDI-MS data in combination with the MALDI-MS/MS data in the proteome analysis comparing IMR-90 fibroblasts in H₂O₂-induced senescent-like phenotype or after stimulation with TGF-β1. Spot number (spot #) and data obtained by Mascot database are given. Only the confirming data that had a score statistically significant are listed. Number of mass values searched, matched or no matched in Mascot is given. A MALDI-TOF mass spectrum annotated with peptides was included for protein identification performed only with MALDI-MS data. Sequences of peptides used for protein identification by MALDI-MS/MS (in grey) in combination with MALDI-MS (“no match”) were also given. In this case, when only one peptide was used for identification, the MS/MS mass spectrum from Mascot search was included. A: Increases in spot intensity in treated cells. B: Decreases in spot intensity in treated cells.

Table S.4: Results from LC-MS/MS

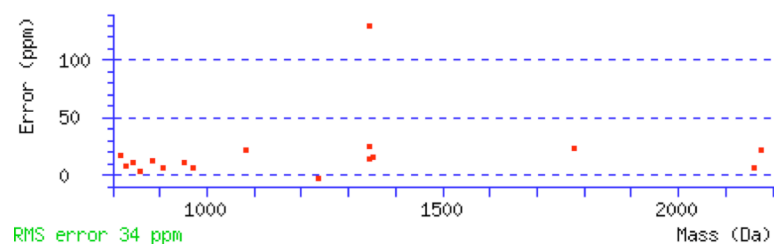
A: Increased intensity

Spot # 752
 Query proteasome alpha 1 subunit
 gil4506179 Mass: 29822 Score: 518
 Queries matched and confirmed: 10

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
2	408.77	815.53	815.51	0.01	0	46	0.0097	LVSLIGSK
9	430.75	859.48	859.48	0.00	0	56	0.0017	QGSATVGLK
13	443.78	885.54	885.53	0.01	0	27	0.75	NVIGIVGK
15	454.20	906.39	906.39	0.01	0	41	0.047	QECLDSR
16	477.24	952.47	952.46	0.01	0	35	0.19	LLCNFMR
20	541.79	1081.57	1081.55	0.02	0	32	0.39	AQSELAHQK
26	413.56	1237.65	1237.65	-0.00	1	30	0.79	RAQSELAHQK
32	673.36	1344.71	1344.68	0.03	0	46	0.028	ETLPAEQDLTK
34	676.34	1350.66	1350.64	0.02	0	60	0.0011	AQPAQPADEPAEK
39	889.93	1777.84	1777.80	0.04	0	78	2.6e-05	NQYDNDVTWSPQGR

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

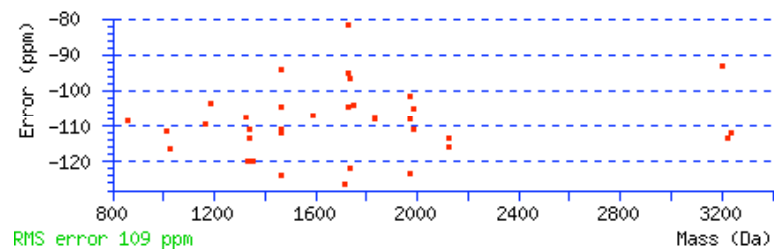
Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
752	4 - 18	889.9283	1777.8420	1777.8019	23	0 NQYDNDVTWSPQGR (Ions score 78, <i>e</i> -value 2.6e-05)
proteasome alpha 1 subunit	31 - 39	430.7468	859.4790	859.4763	3	0 QGSATVGLK (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0017)
	51 - 61	413.5566	1237.6480	1237.6527	-4	1 RAQSELAAHQK (Ions score 30, <i>e</i> -value 0.79)
	52 - 61	541.7945	1081.5744	1081.5516	21	0 AQSELAAHQK (Ions score 32, <i>e</i> -value 0.39)
	83 - 89	477.2436	952.4726	952.4623	11	0 LLCNFMR (Ions score 35, <i>e</i> -value 0.19)
	90 - 96	454.2034	906.3922	906.3865	6	0 QECLDSR (Ions score 41, <i>e</i> -value 0.047)
	108 - 115	408.7703	815.5260	815.5116	18	0 LVSLIGSK (Ions score 46, <i>e</i> -value 0.0097)
	197 - 208	673.3627	1344.7108	1344.6772	25	0 ETLPAEQDLTK (Ions score 46, <i>e</i> -value 0.028)
	209 - 217	443.7769	885.5392	885.5283	12	0 NVSIGIVGK (Ions score 27, <i>e</i> -value 0.75)
	244 - 256	676.3383	1350.6620	1350.6415	15	0 AQPAQPADEPAEK (Ions score 60, <i>e</i> -value 0.0011)



gil12707570 Mass: 31807 Score: 1056 Queries matched and confirmed: 16									
Spot #	mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor [Homo sapiens]								
783	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
	29	432.19	862.36	862.45	-0.09	0	47	0.013	AFAAGADIK
	46	506.19	1010.36	1010.47	-0.11	0	37	0.12	EGMTAFVEK
	74	582.24	1162.46	1162.59	-0.13	0	48	0.013	HWDHLTQVK
	99	668.23	1334.45	1334.61	-0.16	0	65	0.00026	LFYSTFATDDR
	101	669.75	1337.48	1337.63	-0.15	0	69	0.00011	SLAMEMVLTGDR + Oxidation (M)
	119	732.29	1462.56	1462.71	-0.15	1	64	0.00045	LFYSTFATDDRK
	121	733.84	1465.67	1465.84	-0.16	0	72	7.00E-05	NNTVGLIQLNRPK
	138	796.32	1590.63	1590.80	-0.17	2	61	0.001	KLFYSTFATDDRK
	146	865.32	1728.62	1728.79	-0.16	0	79	1.8e-05	ESVNAAFEMTLTEGSK + Oxidation (M)
	152	876.77	1751.53	1751.71	-0.18	0	68	0.00014	EMQNLSFQDCYSSK + Oxidation (M)
	160	915.88	1829.74	1829.94	-0.20	0	94	6.1e-07	IFEEDPAVGAIVLTGGDK
	173	986.40	1970.79	1971.00	-0.21	0	71	0.00012	ALNALCDGLIDELNQALK + Deamidation (NQ)
	176	663.59	1987.74	1987.96	-0.22	0	57	0.0039	ICPVETLVEEAIQCAEK
	192	1062.95	2123.89	2124.13	-0.24	0	89	2.6e-06	AQFAQPEILIGTIPGAGGTQR
	205	1074.72	3221.12	3221.49	-0.37	0	76	7.9e-05	KPVIAAVNGYAFGGGCELAMMCDIIYAGEK + Deamidation (NQ); Oxidation (M)

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
783	mitochondrial short-chain enoyl-coenzyme A hydratase 1 precursor [Homo sapiens]						
	44 - 56	733.8436	1465.6726	1465.8364	-112	0	NNTVGLIQLNRPK (Ions score 72, <i>e</i> -value 7e-05)
	57 - 74	986.4001	1970.7856	1970.9982	-108	0	ALNALCDGLIDELNQALK Deamidation (NQ) (Ions score 71, <i>e</i> -value 0.00012)
	75 - 92	915.8790	1829.7434	1829.9410	-108	0	IFEEDPAVGAIVLTGGDK (Ions score 94, <i>e</i> -value 6.1e-07)
	93 - 101	432.1879	862.3612	862.4548	-108	0	AFAAGADIK (Ions score 47, <i>e</i> -value 0.013)
	102 - 115	876.7729	1751.5312	1751.713	-104	0	EMQNLSFQDCYSSK Oxidation (M) (Ions score 68, <i>e</i> -value 0.00014)
	119 - 127	582.2379	1162.4612	1162.5883	-109	0	HWDHLTQVK (Ions score 48, <i>e</i> -value 0.013)
	128 - 157	1074.7156	3221.1250	3221.4904	-113	0	KPVIAAVNGYAFGGGCELAMMCDIHYAGEK Deamidation (NQ); Oxidation (M) (Ions score 76, <i>e</i> -value 7.9e-05)
	158 - 178	1062.9534	2123.8922	2124.1327	-113	0	AQFAQPEILIGTIPGAGGTQR (Ions score 89, <i>e</i> -value 2.6e-06)
	186 - 197	669.7490	1337.4834	1337.6319	-111	0	SLAMEMVLTGDR Oxidation (M) (Ions score 69, <i>e</i> -value 0.00011)
	212 - 228	663.5870	1987.7392	1987.9594	-111	0	ICPVETLVEEAIQCAEK (Ions score 57, <i>e</i> -value 0.0039)
	242 - 257	865.3188	1728.6230	1728.7876	-95	0	ESVNAAFEMTLTEGSK Oxidation (M) (Ions score 79, <i>e</i> -value 1.8e-05)
	261 - 273	796.3242	1590.6338	1590.8042	-107	2	KLFYSTFATDDRK (Ions score 61, <i>e</i> -value 0.001)
	262 - 273	732.2853	1462.5560	1462.7092	-105	1	LFYSTFATDDRK (Ions score 64, <i>e</i> -value 0.00045)
	274 - 282	506.1881	1010.3616	1010.4742	-111	0	EGMTAFVEK (Ions score 37, <i>e</i> -value 0.12)



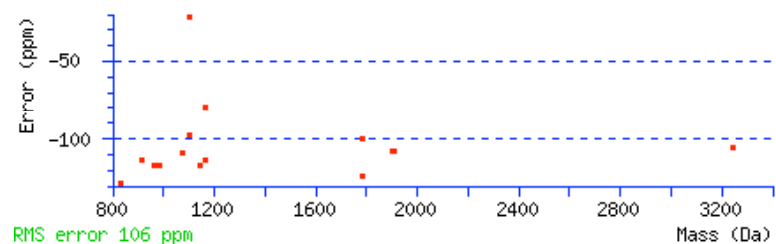
Spot # gil662841 Mass: 22427 Score: 481 Queries matched and confirmed: 7

783 heat shock protein 27 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
41	481.17	960.33	960.45	-0.11	0	39	0.06	GPSWDPFR
43	494.25	986.49	986.60	-0.12	1	32	0.44	RVPFSLLR
56	538.23	1074.45	1074.57	-0.12	0	73	3.9e-05	QLSSGVSEIR
70	573.76	1145.50	1145.63	-0.13	1	38	0.15	TKDGVVEITGK
75	582.25	1162.48	1162.61	-0.13	0	52	0.0054	LFDQAFGLPR
155	892.87	1783.72	1783.90	-0.18	0	62	0.00097	VSLDVNHFAPELTVK + Deamidation (NQ)
169	953.89	1905.76	1905.97	-0.20	0	107	3.4e-08	LATQSNEITIPVTFESR + Deamidation (NQ)

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
783	5 - 12	494.2507	986.4868	986.6025	-117	1	RVPFSLLR (Ions score 32, <i>e</i> -value 0.44)
heat shock protein 27	13 - 20	481.1740	960.3334	960.4453	-116	0	GPSWDPFR (Ions score 39, <i>e</i> -value 0.06)
	28 - 37	582.2483	1162.4820	1162.6134	-113	0	LFDQAFGLPR (Ions score 52, <i>e</i> -value 0.0054)
	80 - 89	538.2322	1074.4498	1074.5669	-109	0	QLSSGVSEIR (Ions score 73, <i>e</i> -value 3.9e-05)
	97 - 112	892.8679	1783.7212	1783.8992	-100	0	VSLDVNHFAPELTVK Deamidation (NQ) (Ions score 62, <i>e</i> -value 0.00097)
	113 - 123	573.7551	1145.4956	1145.6291	-117	1	TKDGVVEITGK (Ions score 38, <i>e</i> -value 0.15)
	172 - 188	953.8890	1905.7634	1905.9683	-107	0	LATQSNEITPVTFESR Deamidation (NQ) (Ions score 107, <i>e</i> -value 3.4e-08)

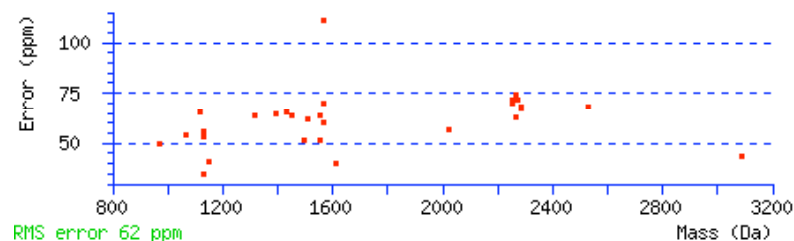


Spot # gil4757718 Mass: 47944 Score: 892 Queries matched and confirmed: 16
 4997 BAF53; BAF complex 53 kDa subunit; BRG1-associated factor; actin-related protein; [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
25	485.81	969.61	969.56	0.05	1	28	0.35	EKL PQVTR
38	534.26	1066.50	1066.44	0.06	0	39	0.1	AGYAGEDCPK
50	561.34	1120.66	1120.59	0.07	0	57	0.00076	TAVLTAFANGR + Deamidation (NQ)
51	565.83	1129.65	1129.61	0.04	0	67	0.00011	LIANN TTVER
57	574.31	1146.61	1146.56	0.05	0	82	4.3e-06	ENMEAISPLK + Oxidation (M)
99	658.39	1314.77	1314.68	0.08	0	41	0.045	IPEGLFDPSNVK
110	698.35	1394.68	1394.59	0.09	0	56	0.0019	DDGSTLMEIDGDK
117	717.42	1432.83	1432.74	0.09	0	92	4.3e-07	VDFPTAIGMVVER
139	748.39	1494.77	1494.70	0.08	0	90	7.4e-07	SPLAGDFITMQCR
154	778.99	1555.96	1555.86	0.10	1	40	0.029	LKIPEGLFDPSNVK
160	785.96	1569.91	1569.73	0.18	0	43	0.027	QGGPTYIIDTNALR + 2 Deamidation (NQ)
202	675.71	2024.09	2023.98	0.11	0	49	0.011	SEASLHPVLMSEAPWNTR
215	1126.65	2251.28	2251.13	0.16	0	40	0.076	ELFQEMNIELVPPYMIASK
224	762.72	2285.15	2284.99	0.15	0	48	0.019	NGMVEDWDSFQAILDHTYK + Deamidation (NQ); Oxidation (M)
238	844.15	2529.41	2529.24	0.17	1	36	0.23	EKL TELMFEHYNIPAFFLCK
264	773.70	3090.77	3090.63	0.14	0	49	0.017	STGLILD SGATHTTAIPVHDGYVLQQGIVK

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
4997	25 - 34	534.2557	1066.4968	1066.4389	54	0	AGYAGEDCPK (Ions score 39, <i>e</i> -value 0.1)
BAF53	35 - 47	717.4232	1432.8318	1432.7384	65	0	VDFPTAIGMVVER (Ions score 92, <i>e</i> -value 4.3e-07)
	48 - 60	698.3458	1394.6770	1394.5871	64	0	DDGSTLMEIDGDK (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0019)
	63 - 76	785.9603	1569.9060	1569.7310	111	0	QGGPTYIYIDTNALR 2 Deamidation (NQ) (Ions score 43, <i>e</i> -value 0.027)
	80 - 89	574.3105	1146.6064	1146.5590	41	0	ENMEAISPLK Oxidation (M) (Ions score 82, <i>e</i> -value 4.3e-06)
	90 - 108	762.7236	2285.1490	2284.9946	68	0	NGMVEDWDSFQAILDHTYK Deamidation (NQ); Oxidation (M) (Ions score 48, <i>e</i> -value 0.019)
	113 - 130	675.7050	2024.0932	2023.9785	57	0	SEASLHPVLMSEAPWNTR (Ions score 49, <i>e</i> -value 0.011)
	134 - 153	844.1456	2529.4150	2529.2435	68	1	EKLTELMFEHYNIPAFFLCK (Ions score 36, <i>e</i> -value 0.23)
	154 - 164	561.3380	1120.6614	1120.5876	66	0	TAVLTAFANGR Deamidation (NQ) (Ions score 57, <i>e</i> -value 0.00076)
	165 - 194	773.6999	3090.7705	3090.6349	44	0	STGLILDGATHTTAIPVHDGYVLQQGIVK (Ions score 49, <i>e</i> -value 0.017)
	195 - 207	748.3935	1494.7724	1494.6959	51	0	SPLAGDFITMQCR (Ions score 90, <i>e</i> -value 7.4e-07)
	208 - 226	751.4364	2251.2874	2251.1268	71	0	ELFQEMNIELVPPYMIASK (Ions score 40, <i>e</i> -value 0.076)
	241 - 248	485.8118	969.6090	969.5607	50	1	EKLQPQVTR (Ions score 28, <i>e</i> -value 0.35)
	302 - 315	778.9874	1555.9602	1555.8609	64	1	LKIPEGLFDPSNVK (Ions score 40, <i>e</i> -value 0.029)
	304 - 315	658.3900	1314.7654	1314.6819	64	0	IPEGLFDPSNVK (Ions score 41, <i>e</i> -value 0.045)
	380 - 389	565.8314	1129.6482	1129.6091	35	0	LIANNTTVER (Ions score 67, <i>e</i> -value 0.00011)



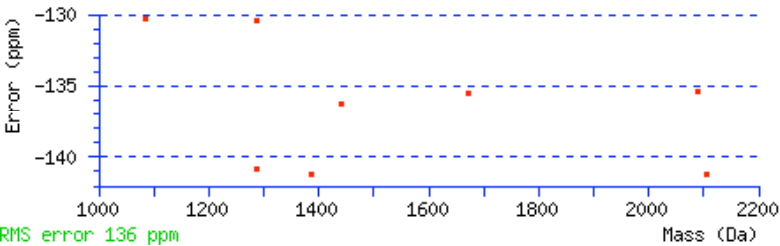
Spot # gil5453854 Mass: 38015 Score: 210 Queries matched and confirmed: 3

5217 poly(rC) binding protein

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
27	543.71	1085.41	1085.55	-0.14	0	37	0.12	IANPVEGSSGR
58	645.21	1288.40	1288.57	-0.17	0	47	0.011	INISEGNCPER + Deamidation (NQ)
108	1045.35	2088.69	2088.97	-0.28	0	50	0.014	ESTGAQVQVAGDMLPNSTER

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5217 poly(rC) binding protein 1	47 - 57	645.2091	1288.4036	1288.5717	-130	0	INISEGNCPER Deamidation (NQ) (Ions score 47, <i>e</i> -value 0.011)
	125 - 144	1045.3531	2088.6916	2088.9745	-135	0	ESTGAQVQVAGDMLPNSTER (Ions score 50, <i>e</i> -value 0.014)
	315 - 325	543.7098	1085.4050	1085.5465	-130	0	IANPVEGSSGR (Ions score 37, <i>e</i> -value 0.12)



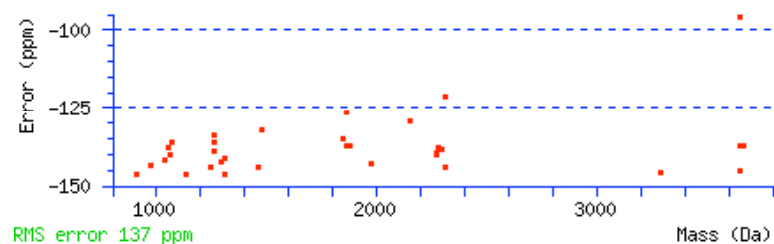
Spot # gil4758112 Mass: 49416 Score: 767 Queries matched and confirmed: 13

455 HLA-B associated transcript 1; HLA-B associated transcript-1; DEAD-box protein; nuclear RNA helicase (DEAD family) [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
27	486.69	971.36	971.50	-0.14	0	29	0.55	ILNDVQDR
40	518.18	1034.34	1034.49	-0.15	0	59	0.00067	MLEQLDMR
47	531.71	1061.41	1061.56	-0.15	1	43	0.033	RDVQEIFR
64	569.25	1136.49	1136.66	-0.17	0	52	0.0057	VAVFFGGLSIK
98	621.73	1241.44	1241.61	-0.18	0	51	0.0055	QVMMFSATLSK
105	630.30	1258.58	1258.75	-0.17	1	36	0.24	RILVATNLFGR
120	648.73	1295.44	1295.63	-0.18	0	39	0.098	GSYVSIHSSGFR
126	653.75	1305.48	1305.66	-0.18	0	40	0.079	NCPHIVVGTPGR
166	731.80	1461.59	1461.80	-0.21	0	37	0.21	LTLHGLQQYYVK
172	740.76	1479.51	1479.71	-0.20	0	42	0.067	GLAITFVSDENDAK + Deamidation (NQ)
222	986.81	1971.61	1971.90	-0.28	1	49	0.017	KFMQDPMEIFVDDETK
251	759.65	2275.93	2276.25	-0.32	0	78	3.1e-05	CIALAQLLVEQNFPALAIHR
256	1150.36	2298.70	2299.02	-0.32	0	71	0.00011	VNIAFNVDMPEDSDTYLHR

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
455	37 - 48	648.7281	1295.4416	1295.6258	-142	0	GSYVSIHSSGFR (Ions score 39, <i>e</i> -value 0.098)
HLA-B associated transcript 1	145 - 155	569.2538	1136.4930	1136.6593	-146	0	VAVFFGGLSIK (Ions score 52, <i>e</i> -value 0.0057)
	164 - 175	653.7455	1305.4764	1305.6611	-141	0	NCPHIVVGTPGR (Ions score 40, <i>e</i> -value 0.079)
	201 - 208	518.1784	1034.3422	1034.4889	-142	0	MLEQLDMR (Ions score 59, <i>e</i> -value 0.00067)
	209 - 216	531.7138	1061.4130	1061.5617	-140	1	RDVQEIFR (Ions score 43, <i>e</i> -value 0.033)
	223 - 233	621.7254	1241.4362	1241.6148	-144	0	QVMMFSATLSK (Ions score 51, <i>e</i> -value 0.0055)
	241 - 256	986.8144	1971.6142	1971.8958	-143	1	KFMQDPMEIFVDDETK (Ions score 49, <i>e</i> -value 0.017)
	257 - 268	731.8009	1461.5872	1461.7979	-144	0	LT LHGLQQYYVK (Ions score 37, <i>e</i> -value 0.21)
	300 - 319	759.6499	2275.9279	2276.2463	-140	0	CIALAQLLVEQNFP AIAIHR (Ions score 78, <i>e</i> -value 3.1e-05)
	339 - 349	630.2972	1258.5798	1258.7509	-136	1	RILVATNLFGR (Ions score 36, <i>e</i> -value 0.24)
	356 - 374	1150.3590	2298.7034	2299.0215	-138	0	VNIAFN YDMPEDSDTYLHR (Ions score 71, <i>e</i> -value 0.00011)
	385 - 398	740.7642	1479.5138	1479.7092	-132	0	GLAITFVSDENDAK Deamidation (NQ) (Ions score 42, <i>e</i> -value 0.067)
	399 - 406	486.6894	971.3642	971.5036	-143	0	ILNDVQDR (Ions score 29, <i>e</i> -value 0.55)

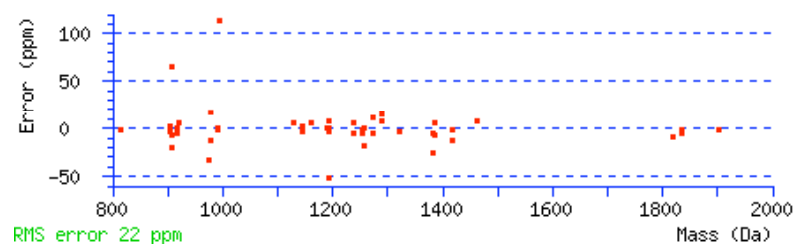


Spot # gil5803225 Mass: 29326 Score: 872 Queries matched and confirmed: 15
 762 tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide; 14-3-3 epsilon;
 mitochondrial import stimulation factor L subunit; protein kina

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
2	408.71	815.41	815.41	-0.00	0	31	0.57	LAEQAER
10	453.72	905.42	905.42	0.00	1	39	0.083	MKGDYHR
12	454.26	906.50	906.52	-0.02	0	41	0.042	NLLSVAYK
26	489.24	976.46	976.49	-0.03	0	37	0.16	QMVETELK
41	566.24	1130.47	1130.46	0.01	0	50	0.0097	YDEMVESMK
50	595.33	1188.65	1188.65	-0.00	0	40	0.077	DSTLIMQLLR
57	597.81	1193.60	1193.59	0.01	0	71	6.6e-05	EAAENSLVAYK
64	619.33	1236.64	1236.65	-0.01	0	63	0.0004	HLIPAANTGESK
67	628.80	1255.58	1255.58	-0.01	0	58	0.0017	YLAEFATGNDR
71	630.29	1258.56	1258.56	0.00	1	50	0.011	YDEMVESMKK
77	645.29	1288.56	1288.54	0.02	0	31	0.88	EALQDVEDENQ
80	661.85	1321.68	1321.69	-0.00	1	46	0.021	KEAAENSLVAYK
84	462.56	1384.65	1384.66	-0.01	1	52	0.0065	YLAEFATGNDRK + Deamidation (NQ)
89	732.36	1462.71	1462.70	0.01	0	72	6.6e-05	VAGMDVELTVEER + Oxidation (M)
101	612.65	1834.92	1834.92	-0.00	0	60	0.0014	AASDIAMTELPPTHPIR + Oxidation (M)

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
762 14-3-3 epsilon	13 - 19	408.7132	815.4118	815.4137	-2	0	LAEQAER (Ions score 31, <i>e</i> -value 0.57)
	20 - 28	566.2418	1130.4690	1130.4624	6	0	YDEMVESMK (Ions score 50, <i>e</i> -value 0.0097)
	30 - 42	732.3621	1462.7096	1462.6973	8	0	VAGMDVELTVEER Oxidation (M) (Ions score 72, <i>e</i> -value 6.6e-05)
	43 - 50	454.2568	906.4990	906.5174	-20	0	NLLSVAYK (Ions score 41, <i>e</i> -value 0.042)
	87 - 94	489.2364	976.4582	976.4899	-32	0	QMVETELK (Ions score 37, <i>e</i> -value 0.16)
	107 - 118	619.3275	1236.6404	1236.6462	-5	0	HLIPAANTGESK (Ions score 63, <i>e</i> -value 0.0004)
	124 - 130	453.7173	905.4200	905.4177	3	1	MKGDYHR (Ions score 39, <i>e</i> -value 0.083)
	131 - 141	628.7961	1255.5776	1255.5833	-4	0	YLAEFATGNDR (Ions score 58, <i>e</i> -value 0.0017)
	142 - 153	661.8488	1321.6830	1321.6877	-4	1	KEAAENSLVAYK (Ions score 46, <i>e</i> -value 0.021)
	143 - 153	597.8087	1193.6028	1193.5927	8	0	EAAENSLVAYK (Ions score 71, <i>e</i> -value 6.6e-05)
	154 - 170	612.6479	1834.9219	1834.9247	-2	0	AASDIAMTELPPTHPIR Oxidation (M) (Ions score 60, <i>e</i> -value 0.0014)
	216 - 225	595.3339	1188.6532	1188.6536	-0	0	DSTLIMQLLR (Ions score 40, <i>e</i> -value 0.077)
	245 - 255	645.2876	1288.5606	1288.5419	15	0	EALQDVEDENQ (Ions score 31, <i>e</i> -value 0.88)



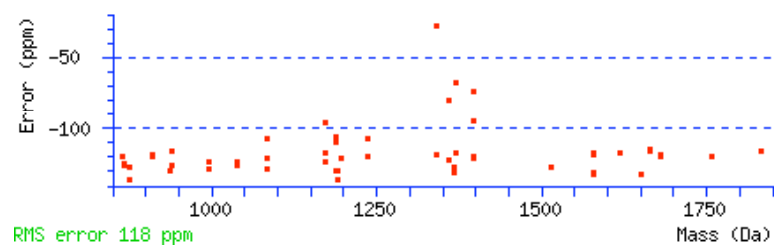
Spot # gil2245365 Mass: 57147 Score: 1189 Queries matched and confirmed: 21

5187a ER-60 protein [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
15	433.68	865.35	865.45	-0.10	1	30	0.51	YKELGEK
18	435.20	868.39	868.50	-0.11	0	53	0.003	DPNIVIAK
21	439.19	876.36	876.48	-0.12	0	58	0.00094	LNFAVASR
35	469.76	937.51	937.63	-0.12	1	41	0.045	LKGIVPLAK
47	520.72	1039.43	1039.57	-0.13	0	38	0.12	TADGIVSHLK
51	542.72	1083.42	1083.56	-0.14	0	48	0.011	YGVSGYPTLK
76	586.71	1171.40	1171.53	-0.14	0	50	0.0063	FVMQEEFSR
83	596.22	1190.43	1190.59	-0.16	0	51	0.0063	LAPEYEEAATR
88	599.29	1196.57	1196.71	-0.14	1	39	0.1	LSKDPNIVIAK
96	618.69	1235.37	1235.51	-0.13	0	53	0.0023	DGEEAGAYDGPR
111	671.27	1340.52	1340.68	-0.16	0	52	0.0062	GFPTIYFSPANK
116	680.25	1358.49	1358.65	-0.17	0	57	0.0015	FLQDYFDGNLK
118	684.75	1367.48	1367.66	-0.18	0	56	0.0024	SEPIPESNDGPVK
120	685.77	1369.53	1369.69	-0.16	0	56	0.0027	ELSDFISYLQR
122	699.21	1396.40	1396.57	-0.17	0	73	2.2e-05	VDCTANTNTCNK
137	505.86	1514.56	1514.75	-0.19	1	34	0.55	FLQDYFDGNLKR
152	790.33	1578.64	1578.83	-0.19	0	48	0.018	EATNPPVIEEEKPK
157	810.30	1618.59	1618.78	-0.19	0	56	0.0029	DLIIAYYDVDYEK
163	551.52	1651.54	1651.76	-0.22	1	44	0.038	IFRDGEEAGAYDGPR
166	840.78	1679.54	1679.75	-0.20	0	87	1.8e-06	MDATANDVPSPYEV + Oxidation (M)
173	916.85	1831.68	1831.90	-0.21	0	62	0.00098	VVVAENFDEIVNNENK

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5187a	63 - 73	596.2232	1190.4318	1190.5931	-135	0	LAPEYEEAATR (Ions score 51, <i>e</i> -value 0.0063)
	74 - 82	469.7627	937.5108	937.6324	-130	1	LKGIVPLAK (Ions score 41, <i>e</i> -value 0.045)
	83 - 94	699.2086	1396.4026	1396.5711	-121	0	VDCTANTNTCNK (Ions score 73, <i>e</i> -value 2.2e-05)
	95 - 104	542.7176	1083.4206	1083.5600	-129	0	YGVSGYPTLK (Ions score 48, <i>e</i> -value 0.011)
	105 - 119	551.5208	1651.5406	1651.7590	-132	1	IFRDGEEAGAYDGPR (Ions score 44, <i>e</i> -value 0.038)
	108 - 119	618.6860	1235.3574	1235.5054	-120	0	DGEEAGAYDGPR (Ions score 53, <i>e</i> -value 0.0022)
	120 - 129	520.7247	1039.4348	1039.5662	-126	0	TADGIVSHLK (Ions score 38, <i>e</i> -value 0.12)
	259 - 271	810.3012	1618.5878	1618.7766	-117	0	DLLIAYYDVDYEK (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0029)
	297 - 304	439.1886	876.3626	876.4817	-136	0	LNFAVASR (Ions score 58, <i>e</i> -value 0.00094)
	336 - 344	586.7050	1171.3954	1171.5331	-118	0	FVMQEEFSR (Ions score 50, <i>e</i> -value 0.0063)
	352 - 362	680.2499	1358.4852	1358.6506	-122	0	FLQDYFDGNLK (Ions score 57, <i>e</i> -value 0.0015)
	367 - 379	684.7459	1367.4772	1367.6568	-131	0	SEPIPESNDGPVK (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0024)
	380 - 395	916.8492	1831.6838	1831.8951	-115	0	VVVAENFDEIVNNENK (Ions score 62, <i>e</i> -value 0.00098)
	416 - 422	433.6826	865.3506	865.4545	-120	1	YKELGEK (Ions score 30, <i>e</i> -value 0.51)
	423 - 433	599.2917	1196.5688	1196.7128	-120	1	LSKDPNIVIAK (Ions score 39, <i>e</i> -value 0.1)
	426 - 433	435.2038	868.3930	868.5018	-125	0	DPNIVIAK (Ions score 53, <i>e</i> -value 0.003)
	434 - 448	840.7796	1679.5446	1679.7460	-120	0	MDATANDVPSPYEVROxidation (M) (Ions score 87, <i>e</i> -value 1.8e-06)
	449 - 460	671.2658	1340.5170	1340.6764	-119	0	GFPTIYFSPANK (Ions score 52, <i>e</i> -value 0.0062)
	472 - 482	685.7712	1369.5278	1369.6877	-117	0	ELSDFISYLQR (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0027)
	483 - 496	790.3264	1578.6382	1578.8253	-118	0	EATNPPVIQEEKPK (Ions score 48, <i>e</i> -value 0.018)



Spot # gil2245365 Mass: 57147 Score: 720 Queries matched and confirmed: 12

5187b ER-60 protein [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Peptide
14	439.19	876.37	876.48	-0.11	0	56	0.0017	LNFAVASR
47	542.72	1083.43	1083.56	-0.13	0	47	0.012	YGVSGYPTLK
65	594.70	1187.39	1187.53	-0.14	0	34	0.2	FVMQEEFSR + Oxidation (M)
67	596.23	1190.45	1190.59	-0.14	0	44	0.037	LAPEYEEAATR
71	599.29	1196.57	1196.71	-0.14	1	37	0.18	LSKDPNIVIAK
78	618.69	1235.36	1235.51	-0.14	0	54	0.0018	DGEEAGAYDGPR
85	671.27	1340.53	1340.68	-0.15	0	50	0.01	GFPTIYFSPANK
87	685.28	1368.55	1368.64	-0.09	0	36	0.25	SEPIPESNDGPVK + Deamidation (NQ)
88	699.21	1396.41	1396.57	-0.16	0	79	6.9e-06	VDCTANTNTCNK
102	790.33	1578.65	1578.83	-0.18	0	36	0.29	EATNPPVIQEEKPK
109	826.79	1651.56	1651.76	-0.20	1	42	0.073	IFRDGEEAGAYDGPR
111	840.80	1679.58	1679.75	-0.17	0	73	5.3e-05	MDATANDVPSPYEVR + Oxidation (M)

Peptide sequences from LC-MS/MS used for protein identification by research in Mascot.

Spot #	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
5187b	63 - 73	596.2347	1190.4548	1190.5931	-116	0	LAPEYEEAAATR (Ions score 44, <i>e</i> -value 0.037)
ER-60 protein	83 - 94	699.2131	1396.4116	1396.5711	-114	0	VDCTANTNTCNK (Ions score 79, <i>e</i> -value 6.9e-06)
	95 - 104	542.7211	1083.4276	1083.5600	-122	0	YGVSGYPTLK (Ions score 47, <i>e</i> -value 0.012)
	105 - 119	826.7891	1651.5636	1651.7590	-118	1	IFRDGEEAGAYDGPR (Ions score 42, <i>e</i> -value 0.073)
	108 - 119	618.6876	1235.3606	1235.5054	-117	0	DGEEAGAYDGPR (Ions score 54, <i>e</i> -value 0.0018)
	297 - 304	439.1940	876.3734	876.4817	-123	0	LNFAVASR (Ions score 56, <i>e</i> -value 0.0017)
	336 - 344	594.7023	1187.3900	1187.5280	-116	0	FVMQEEFSR Oxidation (M) (Ions score 34, <i>e</i> -value 0.2)
	367 - 379	685.2825	1368.5504	1368.6408	-66	0	SEPIPESNDGPVK Deamidation (NQ) (Ions score 36, <i>e</i> -value 0.25)
	423 - 433	599.2936	1196.5726	1196.7128	-117	1	LSKDPNIVIAK (Ions score 37, <i>e</i> -value 0.18)
	434 - 448	840.7967	1679.5788	1679.7460	-100	0	MDATANDVPSPYEVY Oxidation (M) (Ions score 73, <i>e</i> -value 5.3e-05)
	449 - 460	671.2698	1340.5250	1340.6764	-113	0	GFPTIYFSPANK (Ions score 50, <i>e</i> -value 0.01)
	483 - 496	790.3302	1578.6458	1578.8253	-114	0	EATNPPVIQEEKPK (Ions score 36, <i>e</i> -value 0.29)

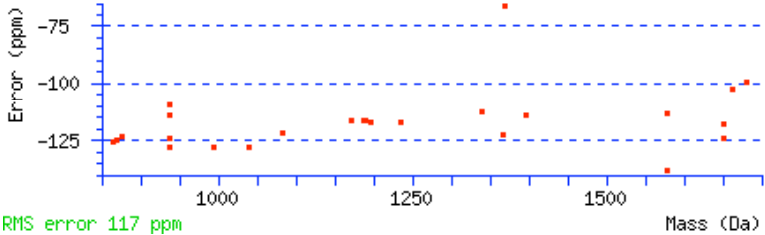


Table S.4: List of proteins identified with the LC-MS/MS data in the proteome analysis comparing IMR-90 fibroblasts in H₂O₂-induced senescent-like phenotype or after stimulation with TGF-β1. Spot number (spot #) and data obtained by Mascot database are given. Sequences of peptides used for identification by LC-MS/MS were also given. Only the confirming data that had a score statistically significant are listed. A: Increases in spot intensity in treated cells. B: Decreases in spot intensity in treated cells.

Annexe 2 : Matériel supplémentaire reprenant les données obtenues en spectrométrie de masse et concernant l'étude de la variation d'abondance des protéines membranaires ou associées aux membranes lors de la sénescence prématurée par un traitement sublétal avec H₂O₂

Nous présentons ces données en regroupant 2 pages par feuille.

1

1842

[gil7669492](#) Mass: 36201 Score: 133 Queries matched: 4

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
1	403.2231	804.4316	804.4243	0.0074	0	33	0.23	1	K.VGVNGFGR.I
2	406.2164	810.4182	810.4058	0.0124	0	45	0.0092	1	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
5	435.2649	868.5152	868.5018	0.0134	0	30	0.26	1	K.VIPELNGK.L
12	706.4170	1410.8194	1410.7831	0.0364	0	25	0.78	1	R.GALQNIIPASTGA.A

[gil4757756](#) Mass: 38808 Score: 125 Queries matched: 2

Annexin A2 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
10	611.8088	1221.6030	1221.5877	0.0153	0	77	6.7e-006	1	K.TPAQYDASELK.A
11	622.8237	1243.6328	1243.6156	0.0172	0	48	0.0051	1	R.TNQELQEINR.V

2

1866

[gil31645](#) Mass: 36202 Score: 353 Queries matched: 6

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	403.2217	804.4288	804.4243	0.0046	0	36	0.096	1	K.VGVNGFGR.I
6	406.2148	810.4150	810.4058	0.0092	0	45	0.01	1	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
8	415.2305	828.4464	828.4341	0.0123	0	49	0.0051	1	K.QASEGPLK.G
11	435.7571	869.4996	869.4858	0.0138	0	35	0.094	1	K.VIPELDGK.L
46	681.8322	1361.6498	1361.6319	0.0179	1	80	3.1e-006	1	R.VVDLMAHMASKE.- + 2 Oxidation (M)
48	706.4096	1410.8046	1410.7831	0.0216	0	57	0.00047	1	R.GALQNIIPASTGA.A

[gil18645167](#) Mass: 38780 Score: 155 Queries matched: 4

Annexin A2 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
18	543.7532	1085.4918	1085.4778	0.0141	0	32	0.21	1	K.AYTNFDAER.D
22	556.2878	1110.5610	1110.5458	0.0153	0	54	0.0014	1	R.QDIAFAYQR.R
33	611.8094	1221.6042	1221.5877	0.0165	0	97	5.8e-008	1	K.TPAQYDASELK.A
37	622.8236	1243.6326	1243.6156	0.0170	0	55	0.0011	1	R.TNQELQEINR.V

3

2065[gil494296](#) Mass: 26457 Score: 147 Queries matched: 3

Cathepsin D

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
5	521.8257	1041.6368	1041.6434	-0.0065	0	42	0.021	1	K.VSTLPAILTK.L
6	523.3021	1044.5896	1044.5968	-0.0071	0	50	0.0037	1	K.QPGITFIAAK.F
8	533.2725	1064.5304	1064.5390	-0.0085	0	55	0.00097	1	K.LSPEDYTLK.V

4

1879

[gil7669492](#) Mass: 36201 Score: 134 Queries matched: 5

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
2	403.2281	804.4416	804.4243	0.0174	0	38	0.065	1	K.VGVNGFGR.I
3	406.2175	810.4204	810.4058	0.0146	0	48	0.005	1	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
10	435.2710	868.5274	868.5018	0.0256	0	35	0.097	1	K.VIPELNGK.L
31	681.8390	1361.6634	1361.6319	0.0315	1	58	0.0005	1	R.VVDLMAHMASKE.- + 2 Oxidation (M)
33	706.4186	1410.8226	1410.7831	0.0396	0	57	0.00048	1	R.GALQNIIPASTGAAK.A

[gil4757756](#) Mass: 38808 Score: 105 Queries matched: 2

Annexin A2 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
25	611.8150	1221.6154	1221.5877	0.0277	0	78	4.6e-006	1	K.TPAQYDASELK.A
28	622.8319	1243.6492	1243.6156	0.0336	0	59	0.00039	1	R.TNQELQEINR.V

5

815

[gi|340219](#) Mass: 53738 Score: 89 Queries matched: 2

Vimentin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
21	655.2858	1308.5570	1308.5986	-0.0415	0	59	0.00035	1	K.NLQEAEWYK.S
22	714.8408	1427.6670	1427.7045	-0.0374	0	30	0.26	1	R.SLYASSPGGVYATR.S

6

1915

[gi|7669492](#) Mass: 36201 Score: 134 Queries matched: 5

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
2	403.2281	804.4416	804.4243	0.0174	0	38	0.065	1	K.VGVNGFGR.I
3	406.2175	810.4204	810.4058	0.0146	0	48	0.005	1	K.LTGMAFR.V + Oxidation (M)
10	435.2710	868.5274	868.5018	0.0256	0	35	0.097	1	K.VIPELNGK.L
31	681.8390	1361.6634	1361.6319	0.0315	1	58	0.0005	1	R.VVDLMAHMASKE.- + 2 Oxidation (M)
33	706.4186	1410.8226	1410.7831	0.0396	0	57	0.00048	1	R.GALQNIIPASTGAAK.A

[gi|4757756](#) Mass: 38808 Score: 105 Queries matched: 2

Annexin A2 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
25	611.8150	1221.6154	1221.5877	0.0277	0	78	4.6e-006	1	K.TPAQYDASELK.A
28	622.8319	1243.6492	1243.6156	0.0336	0	59	0.00039	1	R.TNQELQEINR.V

7

1304

[gi|1587697](#) Mass: 41024 Score: 99 Queries matched: 2

26S proteasome alpha 5 subunit

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	460.2458	918.4770	918.4559	0.0211	0	30	0.35	1	R.NGDFLPTR.L
5	589.8069	1177.5992	1177.5761	0.0232	0	70	3.2e-005	1	R.NAMGSLASQATK.D

8

1286

[gi|340219](#) Mass: 53738 Score: 481 Queries matched: 14

Vimentin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
6	512.2442	1022.4738	1022.5033	-0.0294	0	35	0.11	1	R.QQYESVAAK.N
20	530.7708	1059.5270	1059.5197	0.0074	0	61	0.00031	1	R.QVDQLTNDK.A
22	531.7537	1061.4928	1061.5175	-0.0247	0	42	0.023	1	K.LQEEM <u>L</u> QR.E + Oxidation (M)
28	544.7524	1087.4902	1087.5258	-0.0355	0	74	1.6e-005	1	R.QDVDNASLAR.L
34	547.2539	1092.4932	1092.5200	-0.0267	0	61	0.00023	1	K.FADLSEAANR.N
36	558.2742	1114.5338	1114.5618	-0.0280	0	54	0.0014	1	K.VEHQELNDR.F
37	559.7663	1117.5180	1117.5437	-0.0257	0	57	0.00065	1	R.LQDEIQNMK.E
38	561.2813	1120.5480	1120.5764	-0.0284	0	50	0.0037	1	R.EYQDLLNVK.M
46	608.8008	1215.5870	1215.6208	-0.0337	1	55	0.00098	1	R.RQVDQLTNDK.A
47	627.7731	1253.5316	1253.5598	-0.0281	0	63	0.00016	1	R.LGDLYEEEMR.E
51	655.2946	1308.5746	1308.5986	-0.0239	0	35	0.094	1	K.NLQEAEWYK.S
54	662.2966	1322.5786	1322.6102	-0.0316	0	55	0.00081	1	R.EEAENTLQSFR.Q
60	714.8458	1427.6770	1427.7045	-0.0274	0	54	0.0012	1	R.SLYASSPGGVYATR.S
64	745.8649	1489.7152	1489.7446	-0.0294	0	74	1e-005	1	R.QVQSLTCEVDALK.G

[gi|338695](#) Mass: 50240 Score: 398 Queries matched: 8

β-tubulin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
7	514.7484	1027.4822	1027.5121	-0.0298	0	66	8.5e-005	1	K.TAVCDIPPR.G
25	539.2538	1076.4930	1076.5250	-0.0320	1	45	0.013	1	K.IREEYPDR.I
26	541.1981	1080.3816	1080.4151	-0.0334	0	36	0.074	1	K.NMMAACDPR.H + Oxidation (M)
41	565.7889	1129.5632	1129.5880	-0.0247	0	61	0.00024	1	R.FPGQLNADLR.K
44	580.3069	1158.5992	1158.6219	-0.0227	0	37	0.07	1	K.LAVNMVPPFR.L + Oxidation (M)
55	668.3377	1334.6608	1334.6904	-0.0296	0	87	5.2e-007	1	R.IMNTFSVVPSPK.V + Oxidation (M)
62	723.8344	1445.6542	1445.6820	-0.0278	0	94	1.1e-007	1	K.EVDEQMLNVQNK.N
70	911.9490	1821.8834	1821.9156	-0.0321	0	40	0.023	1	R.EIVHIQAGQCQNQIGAK.F

9

2126

[gi|4506185](#) Mass: 29750 Score: 84 Queries matched: 2

Proteasome alpha 4 subunit [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	500.2582	998.5018	998.4821	0.0197	0	50	0.0032	1	K.QAYTQFGGK.R
4	504.2728	1006.5310	1006.5084	0.0227	0	35	0.1	1	R.TTIFSPEGR.L

10

1639

[gi|976227](#) Mass: 45795 Score: 198 Queries matched: 6

26S proteasome subunit p45 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
8	441.2328	880.4510	880.4477	0.0034	0	25	0.89	1	R.ELFV <u>M</u> AR.E + Oxidation (M)
9	473.7660	945.5174	945.5131	0.0043	0	64	0.00017	1	R.VSGSELVQK.F
10	489.2411	976.4676	976.4614	0.0063	0	48	0.0069	1	R.NDSYTLHK.I
14	579.8367	1157.6588	1157.6445	0.0144	0	28	0.56	1	K.GVLLYGPPGTGK.T
15	645.8034	1289.5922	1289.5848	0.0075	0	113	1.9e-009	1	R.LEGGSGGDSEVQR.T
17	694.8609	1387.7072	1387.7017	0.0056	0	54	0.0011	1	K.IAEL <u>M</u> PGASGAEVK.G + Oxidation (M)

11

1979[gi|5031857](#) Mass: 36950 Score: 219 Queries matched: 4

Lactate dehydrogenase A [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	457.3066	912.5986	912.5756	0.0230	0	36	0.087	1	K.LVIITAGAR.Q
4	506.2519	1010.4892	1010.4669	0.0224	0	46	0.008	1	K.DYNTANSK.L
7	567.7981	1133.5816	1133.5564	0.0252	0	62	0.00021	1	K.VTLTSEEEAR.L
11	624.8184	1247.6222	1247.5928	0.0294	0	77	5.8e-006	1	R.VIGSGCNLDSAR.F

[gi|4757756](#) Mass: 38808 Score: 159 Queries matched: 2

Annexin A2 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
8	611.8177	1221.6208	1221.5877	0.0331	0	97	6.2e-008	1	K.TPAQYDASELK.A
10	622.8321	1243.6496	1243.6156	0.0340	0	62	0.0002	1	R.TNQELQEINR.V

12

2260

[gi|4506195](#) Mass: 22993 Score: 84 Queries matched: 2

Proteasome beta 2 subunit [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
9	509.2685	1016.5224	1016.5185	0.0039	1	42	0.025	1	R.RNLADCLR.S
11	538.7956	1075.5766	1075.5696	0.0071	0	68	5.6e-005	1	R.VAASNIVQMK.D + Oxidation (M)

13

1120

[gi|460789](#) Mass: 51325 Score: 360 Queries matched: 6

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
8	507.2060	1012.3974	1012.4284	-0.0309	0	55	0.0009	1	R.GGDL <u>M</u> AYDR.R + Oxidation (M)
9	507.6807	1013.3468	1013.3760	-0.0292	0	26	0.87	1	R.DYDD <u>M</u> SPR.R + Oxidation (M)
12	527.3086	1052.6026	1052.6342	-0.0316	0	51	0.0028	1	R.VVLIGGKPDR.V
14	549.7144	1097.4142	1097.4448	-0.0305	0	54	0.0011	1	K.GSDFDCELR.L
16	561.7431	1121.4716	1121.5023	-0.0306	0	50	0.0039	1	R.NTDEM <u>M</u> VELR.I + Oxidation (M)
22	630.2739	1258.5332	1258.5677	-0.0345	0	98	4.7e-008	1	K.IDEPLEGSEDR.I

14

1630

[gil976227](#) Mass: 45795 Score: 118 Queries matched: 2

26S proteasome subunit p45 [Homo sapiens]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
4	473.7782	945.5418	945.5131	0.0287	0	53	0.0019	1	R.VSGSELVQK.F
6	645.8162	1289.6178	1289.5848	0.0331	0	104	1.8e-008	1	R.LEGGSGGDSEVQR.

15

1295[gil338695](#) Mass: 50240 Score: 354 Queries matched: 5 β -tubulin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
13	514.7628	1027.5110	1027.5121	-0.0010	0	66	8.6e-005	1	K.TAVCDIPPR.G
27	539.2716	1076.5286	1076.5250	0.0036	1	45	0.013	1	K.IREEYPDR.I
38	565.8015	1129.5884	1129.5880	0.0005	0	61	0.00023	1	R.FPGQLNADLR.K
44	668.3532	1334.6918	1334.6904	0.0014	0	85	8.9e-007	1	R.IMNTFSVVPSPK.V + Oxidation (M)
48	723.8503	1445.6860	1445.6820	0.0040	0	77	5e-006	1	K.EVDEQMLNVQNK.N

[gil340219](#) Mass: 53738 Score: 337 Queries matched: 10

Vimentin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
10	512.2580	1022.5014	1022.5033	-0.0018	0	43	0.014	1	R.QQYESVAAK.N
21	530.7734	1059.5322	1059.5197	0.0126	0	76	9e-006	1	R.QVDQLTNDK.A
22	531.7654	1061.5162	1061.5175	-0.0013	0	43	0.019	1	K.LQEEMQLQR.E + Oxidation (M)
26	538.7553	1075.4960	1075.4968	-0.0007	0	38	0.06	1	R.DNLAEDIMR.L
30	544.7694	1087.5242	1087.5258	-0.0015	0	62	0.00023	1	R.QDVDNASLAR.L
34	559.7791	1117.5436	1117.5437	-0.0001	0	55	0.00095	1	R.LQDEIQNMK.E
35	561.2950	1120.5754	1120.5764	-0.0010	0	50	0.0037	1	R.EYQDLLNVK.M
40	608.8175	1215.6204	1215.6208	-0.0003	1	56	0.0009	1	R.RQVDQLTNDK.A
42	662.3120	1322.6094	1322.6102	-0.0008	0	71	2.2e-005	1	R.EEAENTLQSFR.Q
53	918.9121	1835.8096	1835.7922	0.0174	0	48	0.0043	1	R.DGQVINETSQHDDLE.-

16

2104

[gil2780871](#) Mass: 16342 Score: 72 Queries matched: 2

Proteasome Activator complex

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	420.7934	839.5722	839.5593	0.0130	0	34	0.11	1	K.IVVLLQR.L
7	462.2421	922.4696	922.4616	0.0081	0	38	0.05	1	R.LMVMEIR.N + 2 Oxidation (M)

17

1292[gil340219](#) Mass: 53738 Score: 312 Queries matched: 13

Vimentin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
3	435.7178	869.4210	869.4283	-0.0073	0	35	0.085	1	R.FANYIDK.V
6	466.7321	931.4496	931.4610	-0.0114	0	51	0.0031	1	K.LLEGEESR.I
9	512.2535	1022.4924	1022.5033	-0.0108	0	46	0.0086	1	R.QQYESVAAK.N
15	530.7705	1059.5264	1059.5197	0.0068	0	66	0.0001	1	R.QVDQLTNDK.A
14	523.7659	1045.5172	1045.5226	-0.0053	0	46	0.01	1	K.LQEEMLQRE
20	544.7659	1087.5172	1087.5258	-0.0083	0	64	0.0014	1	R.QVDNASLAR.L
23	547.2634	1092.5122	1092.5200	-0.0077	0	44	0.012	1	K.FADLSEAANR.N
25	558.2846	1114.5546	1114.5618	-0.0072	0	41	0.026	1	K.VEQLQELNDR.F
27	561.2884	1120.5622	1120.5764	-0.0142	0	35	0.099	1	R.EYQDLLNVK.M
31	627.7830	1253.5514	1253.5598	-0.0083	0	48	0.0042	1	R.LGDLYEEEMR.E
36	662.3089	1322.6032	1322.6102	-0.0070	0	53	0.0014	1	R.EEAENTLQSFR.Q
40	714.8558	1427.6970	1427.7045	-0.0074	0	62	0.00018	1	R.SLYASSPGGVYATR.S
44	834.9268	1667.8390	1667.8366	0.0024	0	44	0.0086	1	R.ETNLDLPLVDTHSK.R

[gil338695](#) Mass: 50240 Score: 192 Queries matched: 5

β-tubulin

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
10	514.7593	1027.5040	1027.5121	-0.0080	0	51	0.0027	1	K.TAVCDIPPR.G
19	539.2643	1076.5140	1076.5250	-0.0110	1	44	0.014	1	K.IREEYPDR.I
29	580.3139	1158.6132	1158.6219	-0.0087	0	45	0.011	1	K.LAVNMVPFPR.L + Oxidation (M)
37	668.3498	1334.6850	1334.6904	-0.0054	0	60	0.00027	1	R.IMNTFSVVPSPK.V + Oxidation (M)
42	731.8433	1461.6720	1461.6769	-0.0049	0	70	2.7e-005	1	K.EVDEQMLNVQNK.N + Oxidation (M)

Table S2: List of proteins identified with the MS/MS data in the proteome analysis comparing IMR-90 fibroblasts in H₂O₂-induced premature senescence. Spot number and data obtained by Mascot database are given. Only the confirming data that have a score statistically significant are listed.